

(51) Internationale Patentklassifikation ⁷ : C12N 5/10, A61K 35/14, 48/00	A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 00/66715 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 9. November 2000 (09.11.00)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP00/03984 (22) Internationales Anmeldedatum: 4. Mai 2000 (04.05.00) (30) Prioritätsdaten: 199 20 412.8 4. Mai 1999 (04.05.99) DE 991 18 518.2 18. September 1999 (18.09.99) EP 199 44 858.2 18. September 1999 (18.09.99) DE (71)(72) Anmelder und Erfinder: SHERIFF, Ahmed [DE/DE]; Robert-Rössle-Strasse 10, D-13125 Berlin (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): GEBAUER, Frank [DE/DE]; Kameruner Strasse 5, D-13351 Berlin (DE). (74) Anwälte: MEYERS, Hans-Wilhelm usw.; P.O. Box 10 22 41, D-50462 Köln (DE).	(81) Bestimmungsstaaten: AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG). Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i>	

(54) Title: METHOD FOR DIMINISHING SPECIFIC IMMUNE REACTIONS

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR REDUZIERUNG VON SPEZIFISCHEN IMMUNREAKTIONEN

(57) Abstract

The invention relates to an antigen-presenting cell which mainly presents predetermined antigens (monoantigenic antigen-presenting cell) and which is characterized in that the monoantigenic antigen-presenting cell is capable of dividing and one of the functions of co-stimulator receptors such as a B7 and/or CD40 receptor is suppressed.

(57) Zusammenfassung

Antigen präsentierende Zelle, die überwiegend vorher bestimmte Antigene präsentiert (monoantigene antigen-präsentierende Zelle), dadurch gekennzeichnet, dass die monoantigene antigen-präsentierende Zelle teilungsfähig ist und eine der Funktionen co-stimulatorischer Rezeptoren, wie ein B7 - und/oder CD40-Rezeptor supprimiert ist.

FUNCTION OF THE GENE MANIPULATION ON A CELLULAR LEVEL
 Funktion der Genmanipulation auf zellulärer Ebene

a) NORMAL MECHANISM OF THE T-HELPER CELL ACTIVATION VIA MONOCYTES
 a) normaler Mechanismus der T-Helfer-Zell-Aktivierung über Monozyten

b) MECHANISM OF THE MONOCYTES AFTER GENE MANIPULATION. FAILURE OF T-HELPER CELL ACTIVATION AFTER THE MONOCYTES HAVE BEEN GENETICALLY MANIPULATED.
 b) Mechanismus der Monozyten nach Genmanipulation. Ausbleiben der T-Helfer-Zell-Aktivierung nach Genmanipulation der Monozyten.

D...NATURAL ANTIGEN-PRESENTING MONOCYTE
 E...GENE MANIPULATED ANTIGEN PRODUCING AND -PRESENTING MONOCYTE

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland		Republik Mazedonien	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	ML	Mali	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MN	Mongolei	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MR	Mauretanien	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MW	Malawi	US	Vereinigte Staaten von
CA	Kanada	IT	Italien	MX	Mexiko		Amerika
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CG	Kongo	KE	Kenia	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CM	Kamerun		Korea	PL	Polen		
CN	China	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CU	Kuba	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CZ	Tschechische Republik	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
DE	Deutschland	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DK	Dänemark	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
EE	Estland	LR	Liberia	SG	Singapur		

Verfahren zur Reduzierung von spezifischen Immunreaktionen

Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind Antigen präsentierende Zellen, Verfahren zur Herstellung Antigen präsentierender Zellen, Arzneimittel enthaltend Antigen präsentierende Zellen sowie Verwendung der Antigen präsentierenden Zellen .

Beschreibung

Seit knapp 10 Jahren werden für verschiedene Krankheiten und in Tiermodellen gentherapeutische Verfahren entwickelt und angewendet. Bisher sind sie noch nicht in die Routine überführt. Meist handelt es sich dabei um die Behandlung von genetisch bedingten, schweren Erkrankungen, für die andere Therapien nicht zur Verfügung stehen. Weiterhin werden Gentherapien zur Behandlung von schweren und ebenfalls nicht therapierbaren Krebserkrankungen eingesetzt.

Wenig Aufmerksamkeit hat die experimentelle Medizin bisher der Behandlung von Allergien und Autoimmunerkrankungen mittels gentechnischer Methoden geschenkt.

Allgemeines zu Allergien

Allergien verursachen beträchtliche Kosten im Gesundheitswesen der Industrieländer. Immerhin sind schätzungsweise mindestens 20% der Bevölkerung gegen irgendeine Substanz allergisch. Die meisten Betroffenen leiden an allergischer Rhinitis, zu der insbesondere der Heuschnupfen zählt, oder an Bronchialasthma: Sie niesen oder ringen nach Luft, nachdem sie bestimmte Pollen oder andere im allgemeinen harmlose Substanzen eingeatmet haben. Viele

Kinder und einige Erwachsene reagieren auch allergisch auf Nahrungsmittel. Andere erleiden Hautausschläge oder sogar einen allergischen Schock, nachdem sie Medikamente wie Penizillin erhalten haben. Bei wieder anderen rufen Bienenstiche starke lokale Schwellungen oder schwere systemische - den gesamten Organismus erfassende - Störungen hervor. Im Extremfall können allergische Anfälle sogar zum Tod führen. Allein die unmittelbare medizinische Versorgung von Asthmapatienten hat in den USA 1990 schätzungsweise 3,6 Milliarden Dollar verschlungen und damit rund ein Prozent aller Kosten im Gesundheitswesen ausgemacht.

Mittlerweile ist bekannt, dass einige der zellulären und molekularen Wechselwirkungen bei allergischen Reaktionen oft ähnlich ablaufen, unabhängig davon, auf welche Substanzen der einzelne anspricht und welche Symptome er entwickelt. Gewisse Begleiterscheinungen der Allergien treten normalerweise ausschließlich auf, wenn das Immunsystem Parasiten bekämpft. So reagiert der Körper auf Schmarotzer ebenso wie auf Allergene mit der massiven Produktion von Molekülen, die als Immunglobulin-E-Antikörper (IgE) bezeichnet werden. Die Produktion dieser Antikörper wird durch T-Helfer-Zellen induziert, die wiederum von antigen-präsentierenden Zellen aktiviert werden.

Sensibilisierung

Unterschiedliche Allergene rufen unter anderem deswegen verschiedenartige Symptome hervor, weil sie mit dem Immunsystem in verschiedenen Körperregionen in Berührung kommen. In den oberen Luftwegen erzeugt die fehlgeleitete Immunreaktion Niesen und eine verstopfte Nase. In den unteren Luftwegen können dagegen die Bronchien sich verengen und verschleimen, so dass typische asthmatische Symptome auftreten. Entsprechend rufen Immunaktivitäten in den Geweben des Magen-Darm-Traktes Übelkeit, Bauchkrämpfe, Durchfall oder Erbrechen hervor.

Schließlich vermag ein Allergen, dass auf irgendeinem Weg ins Blut gelangt, eine Anaphylaxe auszulösen: eine allergische Reaktion in weit von seiner Ein-

trittsstelle entfernten Körperregionen. Schwere anaphylaktische Schocks können alle normalen Körperfunktionen durcheinanderbringen und tödlich enden.

Auch wenn sich die allergischen Reaktionen unterschiedlich äußern, werden sie doch stets durch den gleichen Mechanismus in Gang gesetzt: die Sensibilisierung. Dazu kann bereits der einmalige Kontakt mit einem Allergen, typischerweise einem Eiweißstoff, genügen. In den Luftwegen oder anderen Geweben trifft die allergieauslösende Substanz auf sogenannte Fresszellen oder Makrophagen. Diese verschlingen den Fremdstoff, zerstückeln ihn und präsentieren die Fragmente auf der Zelloberfläche mit MHC II-Molekülen. Im weiteren Verlauf erkennen einige T-Helfer-Lymphozyten die dargebotenen Bruchstücke und binden daran. Die T-Helfer-Lymphozyten werden von den Makrophagen aktiviert und aktivieren dann ihrerseits einige B-Lymphozyten, die gleichfalls das Allergen erkennen. Die B-Zellen reifen dann zu Antikörper produzierenden Plasmazellen aus. Zunächst sind dies Antikörper vom sogenannten IgM-Typ; ab einem bestimmten Zeitpunkt schalten die Plasmazellen jedoch auf IgE-Antikörper um.

Bis die Antikörper hergestellt sind, können Tage oder Wochen vergehen, und das Allergen, welches ihre Produktion in Gang gesetzt hat, ist dann womöglich schon lange verschwunden. Nicht so die IgE-Moleküle. Mit ihrer Fc-Region heften sie sich an IgE-Rezeptoren zweier unterschiedlicher Klassen von Immunsystemzellen. Bei der einen handelt es sich um Mastzellen, die sich im Körpergewebe für gewöhnlich in der Nähe von Blutgefäßen und Epithelzellen ansiedeln. Über das Epithel besteht Kontakt mit der Außenwelt (darunter fällt auch das Epithel der Atemwege und des Magen-Darm-Traktes). IgE-Antikörper binden außerdem an basophile Granulozyten (Basophile). Diese Zellen zirkulieren allerdings im Blutstrom.

Hat die Produktion der IgEs einmal begonnen, hält sie offenbar Monate, ja manchmal sogar Jahre an. Folglich besetzen sie unablässig IgE-Rezeptoren auf Mastzellen und Basophilen - bereit beim nächsten Allergenkontakt augenblicklich in Aktion zu treten.

Akute Symptome

Während also die erste Begegnung mit einem Allergen selbst bei Personen, die sich später als Allergiker entpuppen, keine Symptome hervorruft, leitet die Zweitexposition ein Stadium der Überempfindlichkeitsreaktion ein, welches auch äußerlich in Erscheinung tritt. Innerhalb von Sekunden nach dem Kontakt mit menschlichem Gewebe bindet der allergieauslösende Stoff an die IgEs der Mastzellen. Heftet er sich dabei an zwei oder mehr IgE-Moleküle zugleich, bildet er eine Brücke zwischen ihnen. Solche Quervernetzungen lassen die betroffenen IgE-Rezeptoren dichter zusammenrücken, und dies aktiviert die Zelle, so dass sie hochwirksame Substanzen ausschüttet, die auf direktem Wege allergische Symptome erzeugen. (Die Freisetzung kann auch auf andere Arten hervorgerufen werden; von allergischen Reaktionen spricht man nur, wenn IgEs beteiligt sind). Die wichtigste dieser Substanzen ist Histamin. Es kann sowohl die Schleimbildung in den Epithelien anregen und so zur Verstopfung der Luftwege beitragen als auch die glatte Muskulatur, die wie ein elastisches Band Bronchien und Därme umschlingt, kontrahieren lassen. Ferner vermag es die feinen Blutgefäße zu weiten und durchlässiger zu machen, so dass Flüssigkeit ins Gewebe sickern kann. Rötungen und Schwellungen sind die Folge. Betreffen diese Gefäßveränderungen große Teile des Körpers, können sie ein tödliches Kreislaufversagen auslösen: Bei einem solchen Schock fällt der Blutdruck jäh so stark ab, dass die Sauerstoffversorgung von Herz und Gehirn nicht mehr gewährleistet ist.

Die zweite Gruppe von Mediatoren besteht hauptsächlich aus Prostaglandinen und Leukotrienen. Sie werden erst erzeugt, nachdem die Allergenmoleküle sich an die IgEs auf den Zellen angelagert haben. Wie Histamin verengen sie die Bronchien und erweitern die Blutgefäße. Ihre Wirkung hält allerdings länger an.

Zusätzlich stoßen stimulierte Mastzellen eine Vielzahl potentiell toxischer Enzyme aus. Offenbar setzen sie ferner Cytokine frei, die die Aktivitäten anderer Immunzellen regulieren.

Behandlung: 1. Die allergische Rhinitis

Antihistaminika erweisen sich in der Regel als wirksam und dienen immer noch als Standardtherapie. Die neuesten Varianten können die Blut-Hirn-Schranke nicht mehr ohne weiteres passieren und machen die Patienten nicht mehr müde. Wenn bei einer schweren Entzündung Antihistaminika wirkungslos bleiben, helfen oft inhalierbare Corticosteroide, die gewöhnlich zur Linderung der chronischen Entzündung bei Asthma verschrieben werden.

In schweren Fällen kann die schon im Jahre 1911 eingeführte Immuntherapie oder Hyposensibilisierung (auch als Allergiespritzen oder Desensibilisierung bekannt) auf lange Sicht Erleichterung verschaffen. Bei dieser Behandlung injizieren Ärzte den Patienten steigende Dosen des Allergens, auf das diese empfindlich reagieren. In allen Fällen ist die Dosis ausschlaggebend: Zu wenig Allergen verleiht keine Toleranz. Außerdem ist der Schutz selten vollständig.

2. Asthma

Bronchodilatoren sind die meistverwendeten Arzneimittel bei Asthma. Sie lindern die durch Histamin und andere Bronchokonstriktoren hervorgerufenen Symptome sehr schnell, beeinflussen die zugrundeliegende Entzündung jedoch wahrscheinlich nicht. Außerdem kann ihr übermäßiger Gebrauch eine Gegenreaktion des Körpers hervorrufen, so dass nach Abklingen ihrer Wirkung der Atemstrom stärker behindert ist als zuvor. Zusätzlich kommen die unter 1. aufgezählten Methoden zur Anwendung.

3. Anaphylaktische Reaktionen

Insektenstiche rufen bei manchen Menschen Anaphylaxien aus. In schweren Fällen führen diese zum Tod durch z.B. Kreislaufversagen oder Erstickten. Jede schwere Anaphylaxie - gleich ob sie zum ersten oder fünfzehnten Mal auftritt - ist ein Notfall, bei dem zunächst versucht werden muss, die bedrohlichsten Symptome zu beherrschen. Meist geschieht das durch Injektion von Adrenalin, welches die Freisetzung der Mediatoren hemmt, die Luftwege öffnet und der Erweiterung der Blutgefäße entgegenwirkt. Man kann vorbeugend durch eine Immunisierung mit dem Gift des gesundheitsbedrohenden Insekts agieren.

Neue Ansätze

In der Erprobung im Tiermodell befindet sich die auf DNA basierende Immunisierung mit einem Allergen (Der p 5) der Milbe *Dermatophagoides pteronyssinus*. Diese Immunisierung resultiert in einer Produktion von IgG, aber nicht IgE, und resultiert in einer 90%tigen Reduktion der Mengen an spezifischem IgE, welche durch klassische Sensibilisierung mit Der p 5 und Alaun als Adjuvant oder allergen-induzierte Rhinitis hervorgerufen wurden.

Eine weitere neue Strategie ist die Verwendung von humanisierten monoklonalen Anti-IgE-Antikörpern gegen die FcεRI-Binderegion für IgE. Dadurch wird die Bindung von IgE an den IgE-Rezeptor verhindert, so dass keine Mediatoren der allergischen Reaktion von Mastzellen oder Basophilen ausgeschüttet werden können. Diese Strategie hat in klinischen Studien bei Patienten mit allergischer Rhinitis und allergischem Asthma gezeigt, dass diese Antikörper gut toleriert werden und die allergischen Reaktionen reduzieren.

(siehe auch L.M. Lichtenstein: "Allergie und Immunsystem"; in Spektrum der Wissenschaft Spezial: Das Immunsystem; 1994; 74-83; S-K Huang, K-Y Chua und K-H Hsieh: Allergen gene transfer. Current Opinion in Immunology 1997; 800-804; C. Heusser und P. Jardieu: Therapeutic potential of anti-IgE antibodies. Current Opinion in Immunology 1997; 805-814).

Allgemeines zu Transplantationen

Die Transplantation von Geweben, um kranke Organe zu ersetzen, ist heute eine wichtige medizinische Therapie. In den meisten Fällen stellt eine Reaktion des anpassungsfähigen Immunsystems gegen das Transplantat die größte Bedrohung für eine erfolgreiche Behandlung dar. Reaktionen des anpassungsfähigen Immunsystems werden von Antigen-präsentierenden Zellen durch Aktivierung von T-Helfer-Lymphozyten induziert. Bei der Transfusionen von Blut, welches das erste und am häufigsten verwendete Transplantat ist, müssen die ABO und Rh Blutgruppenantigene abgeglichen werden, damit die schnelle Zerstörung unpassender Erythrozyten vermieden wird. Bei anderen Geweben müssen die sehr polymorphen Haupthistokompatibilitätskomplexe (MHC) aufeinander abgeglichen werden, da diese fast immer die Immunreaktion auslösen. Leider ist der perfekte Abgleich der MHCs außer bei Verwandten fast unmöglich.

Obwohl die Immunreaktion Organtransplantationen schwierig macht, gibt es wenige Alternativen bei Organausfällen. Die Verwendung von potenten immunsuppressiven Drogen, besonders Cyclosporin A und FK-506, die die Aktivierung von T-Zellen verhindern, macht Organtransplantationen erfolgreich. Trotzdem laufen hier einige Probleme auf, da das Leiden, welches das eigene Organ zerstört hat, auch das fremde Organ zerstört. Außerdem steigt durch die Unterdrückung des Immunsystems, das Risiko an Krebs oder Infektionen zu erkranken. Zudem ist die Prozedur sehr kostspielig (Janeway and Travers 1997).

Allgemeines zu Autoimmunerkrankungen

Autoimmunerkrankungen gehören zu den chronischen Erkrankungen. Zu ihnen zählen Rheuma in verschiedensten klinischen Ausprägungen, Diabetes, Multiple Sklerose, bestimmte Formen von Herzmuskelentzündungen und von Schilddrüsenerkrankungen. Die Reihe von Autoimmunerkrankungen ließe sich

beliebig fortsetzen, wobei ca. 90% allerdings epidemiologisch nur einen kleinen Prozentsatz ausmachen.

Die klinischen Verläufe von Autoimmunerkrankungen selbst bei ein- und derselben Diagnose können sehr unterschiedlich sein. Z. T. werden schubartige Krankheitsverläufe beobachtet. Entsprechend werden die Behandlungen vom Arzt individuell gestaltet.

Einige der Autoimmunerkrankungen sind antikörpervermittelt. Darunter wird in der Immunologie verstanden, dass der Organismus aus meist nicht bekannten Ursachen Antikörper produziert, welche sich gegen körpereigene zelluläre Strukturen (Autoantigene) richten. Sind diese Antikörper einmal gebildet, lösen sie durch ihre Interaktion und Bindung an die jeweiligen organ- oder zellspezifischen Strukturen eine zell- und gewebserstörende Reaktion des Immunsystems aus. Letztendlich führt diese dann zu dem klinischen Bild der Erkrankung (Steinman 1994).

Beispiel hierfür ist die Schilddrüsenerkrankung Morbus Basedow, aber auch eine Form der Herzmuskelentzündung, die zur Dilatativen Cardiomyopathie führt. In einigen Fällen sind sowohl die Targets, gegen die sich die Autoantikörper richten, als auch die Autoantikörper selbst, genau charakterisiert.

WO-A-96/18736 offenbart ein Verfahren und ein Reagenz zur Behandlung von arthritischen Bedingungen, Induktion von Toleranz bei Verpflanzungen und Umkehrung von Immunreaktionen. Dabei wird die Möglichkeit, die Expression von B7-1, B7-2 und B7-3 durch Ribozyme oder Antisense-RNA zu unterdrücken, theoretisch erörtert. Die Unterdrückung der B7-Mengen durch ein B7-Ribozym und B7-Antisense-RNA werden zwar nicht durch Experimente verifiziert, aber eine reine Unterdrückung von B7 würde im besten Falle eine allgemeine Reduzierung der gesamten Reaktionen des anpassungsfähigen Immunsystems bewirken.

Die WO-A-95/32734 beschreibt die Verhinderung co-stimulatorischer Aktivitäten von antigen-präsentierenden Zellen, indem FcγRII-Rezeptoren durch aggregierte IgG-Moleküle vernetzt werden. Eine Unterdrückung von T-Zell-vermittelten Krankheiten soll erreicht werden, indem gleichzeitig die FcγRII-Rezeptoren vernetzt und spezifische Antigene verabreicht werden.

Die WO-A-98/29124 betrifft injizierte Antisense-Oligonukleotide, mit denen die B7-Mengen reduziert werden sollen. Damit kann die Expression von B7 höchstens unspezifisch in allen Zellen behindert werden.

WO-A-97/44450 offenbart die Erhöhung oder Unterdrückung von Prozessen, die auf sequenzspezifischen Interaktionen von Nukleinsäuren mit der Zellmaschinerie beruhen. Insbesondere können Genpromotor-unterdrückende Nukleinsäuren eingesetzt werden, die mit Genpromotormotiven für die Erhöhung oder Unterdrückung der Transkription eines Zielgens interagieren. Im Detail werden mit einer Utron-Nukleinsäure, dem TSU, die Expression von MHCs der Klassen I und II, sowie von ICAM-1, B7-1, B7-2 und FcγR behindert. Ein solcher Eingriff könnte insbesondere für Organtransplantate von Nutzen sein, bei denen die Expression von MHC-Molekülen die entscheidenden Abstoßungsreaktionen hervorruft. Utron-Nukleinsäuren stammen aus den 3'-untranslatierten Regionen von mRNAs. Diese 3'-untranslatierten Regionen werden so genannt, wenn sie *in vivo* Aktivitäten entfalten, die zelluläre Prozesse durch sequenzspezifische Interaktionen mit einem Teil der zellulären Maschinerie stimulieren oder inhibieren. Bei der zellulären Maschinerie handelt es sich gemäß WO -A-97/44450 um Promotoren. Es wird dort zwar über die Möglichkeit der Unterdrückung der B7-Expression (1 und 2) mit gentechnischen Methoden spekuliert, aber eine solche Inhibition kann mit dem aufgezeigten Mittel nur in Zusammenhang mit der Inhibition weiterer Gene (MHCs der Klassen I und II, sowie von ICAM-1 und FcγR) geschehen. Eine solch weitreichende Inhibition ist kontraproduktiv, da man auf eine hohe MHC-Expression angewie-

sen ist. Außerdem ist eine Regulation auf der Promotorebene nachteilig, da keine Möglichkeit besteht, um hinreichend spezifisch zu wirken.

WO-A-99/50394 offenbart teilungsfähige aus Monozyten gewonnene Zellen. Es werden keine Monozyten beschrieben, die vorwiegend vordefinierte Antigene präsentieren. Es wird kein Gentransfer vorgesehen, der für eine verminderte Anzahl von CD80, CD86, CD40 an der Zelloberfläche sorgt. Vielmehr wird deren verminderte Präsenz durch die Behandlung mit z. B. physikalischen Methoden wie UV-Licht erreicht, wodurch auch die beschriebenen anderen Charakteristika hervorgerufen werden.

Das der Erfindung zu Grunde liegende Problem besteht unter anderem darin, gentechnologische, therapeutisch nutzbare Produkte für die Reduktion von spezifischen Immunreaktionen zur Verfügung zustellen, bei denen Targets (Antigene, Autoantigene) und Antikörper, Autoantikörper bekannt sind.

Gelöst wird das Problem durch die erfindungsgemäße antigen-präsentierende Zelle, die überwiegend vorher bestimmte Antigene präsentiert (monoantigene antigen-präsentierende Zelle) und dadurch gekennzeichnet ist, dass die monoantigene antigen-präsentierende Zelle teilungsfähig ist und eine der Funktionen co-stimulatorischer Rezeptoren der Zelle, wie ein B7- und/oder CD40-Rezeptor supprimiert ist.

Vorteilhaft an der antigen-präsentierenden Zelle gemäß der Erfindung ist, dass man die Zellen vermehren und z. B. Makrophagen und dendritischen Zellen differenzieren kann. Durch Erhalt der Teilungsfähigkeit werden diese Zellen im Grunde erst für den Gentransfer durch die gängigen nicht replikationsfähigen Retroviren geeignet, da diese erst bei der Teilung ins Genom eingebaut werden.

Figur 1 zeigt ein Schema zur Funktion der Genmanipulation auf zellulärer Ebene.

- a) normaler Mechanismus der T-Helfer-Zell-Aktivierung über Monozyten
- b) Mechanismus der Monozyten nach Genmanipulation. Ausbleiben der T-Helfer-Zell-Aktivierung nach Genmanipulation der Monozyten.

Figur 2 zeigt eine "Normale" Immunreaktion zur Antikörperbildung, Antigen-präsentierende Monozyten als Induktoren der Antikörperproduktion. Monozyten nehmen als fremd erkannte Moleküle auf und bringen sie auf die Zelloberfläche (Antigenpräsentation). Gemeinsam mit einem Oberflächenmolekül (B7) wird das Antigen den T-Helferzellen präsentiert. Das präsentierte Antigen wird von T-Helfer-Lymphozyten erkannt, die ihrerseits B-Zellen zur Antikörperproduktion anregen. Das Schema ist stark vereinfacht.

Figur 3 zeigt schematisch die Funktion der Genmanipulation auf molekularer Ebene: der Co-stimulierende Rezeptor B7 wird inaktiviert.

Figur 4 (I) zeigt die Funktion der Genmanipulation auf molekularer Ebene: das Autoantigen wird von den B7-inhibierten antigenpräsentierenden Zellen synthetisiert

Figur 4 (II) zeigt einen Vergleich der Antigenpräsentation von "normalen" und gentechnisch veränderten Monozyten.

Figur 5 demonstriert die Funktion der genetisch veränderten Monozyten im Körper.

Vorzugsweise ist die erfindungsgemäße monoantigene antigen-präsentierende Zelle ein Monozyt, eine dendritische Zelle und/oder ein Makrophage.

Die APCs sind die Schaltstellen des anpassungsfähigen Immunsystems. Nur sie können eine solche Immunantwort auslösen. Dies sei in folgenden Abbildungen am Beispiel von Monozyten und der durch T-Helfer-Zellen ausgelösten Antikörperproduktion gezeigt:

Innerhalb des Immunsystems spielen die Antikörper normalerweise als Abwehrmoleküle ("humorale Immunreaktion") eine wichtige Rolle. Sie werden von ausgereiften B-Lymphozyten produziert. Die Induktion und Produktion der Antikörper erfolgt allerdings nicht unabhängig von den restlichen Zellen des Immunsystems; vielmehr wird diese humorale Immunreaktion von anderen Zellen des Immunsystems gesteuert.

Die Antikörperproduktion - und so auch die Produktion der pathologischen Autoantikörper - lässt sich nicht aufrechterhalten ohne die Hilfe und Vermittlung von Monozyten und T-Helfer-Lymphozyten, die ihrerseits antigenspezifisch die B-Lymphozyten aktivieren (Fig.1).

Die molekularen Mechanismen der Interaktion - des Zell-Zell-Kontakts - von Monozyten mit den T-Helfer-Lymphozyten ist auf Rezeptorebene bis ins Detail bekannt (Figur 2).

Handelt es sich bei dem Antigen z.B. um ein Bakterienprotein, ist die Immunreaktion für den Organismus nützlich. Ist das Antigen allerdings eine körpereigene Struktur, spricht man von einer (pathologischen) Autoimmunreaktion.

Neben dem zu präsentierenden Antigen (gegen welches sich die zu produzierenden Antikörper richten) sind auf der Zelloberfläche verschiedene Rezeptoren und Hilfsrezeptoren am Zell-Zell-Kontakt und der Zellaktivierung beteiligt. Ein essentielles Molekül der interzellulären Wechselwirkung bei der Antigenpräsentation (Kontakt von Monozyt mit den T-Helfer-Lymphozyten) ist ein costimulierender Rezeptor mit der Bezeichnung B7 (Figur 2)

Die erfindungsgemäße monoantigene antigen-präsentierende Zelle weist vorzugsweise durch eine Transformation einer antigen-präsentierenden Zelle mit nukleinsäurehaltigem Material eine erhöhte Expression eines Antigens auf, wobei die antigen-präsentierende Zelle im wesentlichen nur eine Sorte eines Antigens präsentiert.

Das konzipierte gentherapeutische Verfahren beruht auf zwei parallelen gentechnologischen Eingriffen an patienteneigenen Blutmonozyten. Die Eingriffe erfolgen mittels geeigneter Sonden und bewirken die Verminderung von B7-Molekülen durch die Behinderung und damit der Verhinderung der Ausbildung des Moleküls auf der Oberfläche der Monozyten (Figur 3) und gleichzeitig eine starke Präsentation des Autoantigens (Figur 4).

Verminderung der spezifischen Antikörperproduktion durch Gentherapie

Die Produktion pathologischer Autoantikörper wird durch die Manipulation von Monozyten spezifisch abgeschaltet. Der Co-Rezeptor B7, ohne den die Antigenpräsentation bzw. die Induktionskaskade zur Antikörperproduktion nicht anläuft, wird unterdrückt. Hinter dem Begriff B7 verbergen sich zwei unterschiedliche Co-Rezeptoren, die als CD80 (B7-1) und CD86 (B7-2) bezeichnet werden. Ihre Strukturen sind bekannt.

Nach dem Abschalten der Antikörperproduktion verschwinden die im Blut zirkulierenden Autoantikörper aufgrund des natürlichen Abbaus und des fehlenden Nachschubs.

Nach der *in vitro* Manipulation der Monozyten werden die Zellen in die Blutbahn des Patienten zurückgegeben. Die genmanipulierten Monozyten schalten nunmehr die im Organismus befindlichen entsprechenden T-Helfer-Lymphozyten ab. Die genmanipulierten Zellen treten dabei unmittelbar in Konkurrenz zu den bereits im Organismus (vorzugsweise Blutbahn und Lymphsystem) vorhandenen Autoantigen-präsentierenden Monozyten, die allerdings

B7 auf der Zelloberfläche tragen und normalerweise die T-Helfer-Lymphozyten und damit die Antikörperproduktion aktivieren (Figur 5).

Antigenpräsentation bei gentechnisch veränderten Monozyten

Die cDNA eines Proteins, das als Autoantigen die Produktion pathologischer Autoantikörper hervorruft, wird in das Monozytengenom integriert. Diese Erbinformation dient dann zur Überproduktion des Autoantigens. Peptide dieses Autoantigens werden daraufhin bevorzugt an MHC II und/oder MHC I präsentiert (siehe auch Figur 4(II)). MHC II präsentiert die Peptide den T-Helferzellen und versucht solche zu finden, die spezifisch die präsentierten Proteine erkennen. Wenn der Co-Rezeptor B7 nicht gleichzeitig an der Zelloberfläche erscheint, werden die T-Helferzellen stillgestellt und unterliegen einem vorzeitigen Zelltod.

Alle genmanipulierten Monozyten präsentieren an den meisten ihrer MHC II-Komplexe das Autoantigen, während *in vivo* nur sehr wenige "normale" Monozyten das Autoantigen präsentieren und dann auch nur an wenigen MHC II-Komplexen. Es ist Ziel der Behandlung, *in vivo* die "normalen" Monozyten, die das Autoantigen präsentieren und die T-Helfer-Zellen aktivieren, zu verdrängen durch die auf Abschaltung der Antikörperprodukte programmierten, genmanipulierten Monozyten.

Die erfindungsgemäße monoantigene antigen-präsentierende Zelle kann insbesondere eine erhöhte Anzahl von Homing-Rezeptoren, wie CD44, aufzeigen. Eine Überexpression von Homing-Rezeptoren wird der monoantigenen Antigen-präsentierenden Zelle den Weg in die Lymphknoten weisen, wodurch die genmanipulierten APCs sich vermehrt und schneller in Lymphknoten ansammeln. Die Lymphknoten sind der Ort, an dem die allermeisten Reaktionen des anpassungsfähigen Immunsystems hervorgerufen werden. Dort entfalten die genmanipulierten APCs daher eine um ein vielfaches höhere Wirkung als außerhalb der Lymphknoten.

In einer bevorzugten Ausführungsform der erfindungsgemäßen monoantigenen antigen-präsentierenden Zelle bewirkt eine Transformation eine Erhöhung der Anzahl von Homing-Rezeptoren und/oder eine Suppression von Funktionen der B7-, CD40-Rezeptoren.

Insbesondere mit Antisense-Nukleinsäuren kann die B7- und/oder CD40-Rezeptor Expression in der erfindungsgemäßen monoantigenen antigen-präsentierenden Zelle verhindert oder reduziert werden..

Alternativ kann mit Nukleinsäuren eine Unterdrückung der Expression der B7- und/oder CD40-Rezeptoren durch Co-Suppression in der erfindungsgemäßen monoantigene antigen-präsentierende Zelle bewirkt werden.

Die erfindungsgemäße monoantigene antigen-präsentierende Zelle kann Nukleinsäuren enthalten oder transformiert sein, die eine Expression von mit B7- und/oder CD40-Rezeptoren affinen Strukturen aufweisenden Proteinen oder Peptiden bewirken. Damit werden Proteine gebildet, die durch Komplexbildung mit B7 - und/oder CD40-Rezeptoren praktisch neutralisieren. Insbesondere kommen dazu CTLA4, CD28, Antikörper, F(ab)₂, scFv und/oder F_{ab}-Fragmente als Proteine in Betracht.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform enthält die erfindungsgemäße monoantigene antigen-präsentierende Zelle Nukleinsäuren, die für eine Signalsequenz kodieren oder Expressionsprodukte einer Signalsequenz, die den Verbleib der Expressionsprodukte im endoplasmatischen Retikulum, dem Golgi-Apparat, dem Trans-Golgi-Netzwerk oder intrazellulären Vesikeln bewirkt.

Die erfindungsgemäße monoantigene antigen-präsentierende Zelle wird zur Expression von Antigenen mit Nukleinsäuren transformiert, die den Transport der exprimierten Antigene in MHC II-Kompartimente der Zellen ermöglichen.

Alle genmanipulierten Monozyten präsentieren an den meisten ihrer MHC-Komplexe das Autoantigen, während nur sehr wenige "normale" Monozyten überhaupt das Autoantigen präsentieren und dann auch nur an wenigen MHC-Komplexen. Es ist Ziel der Behandlung, die "normalen" Monozyten, die das Autoantigen präsentieren und die T-Helfer-Zellen aktivieren, zu verdrängen durch die auf Abschaltung der Antikörperprodukte programmierten, genmanipulierten Monozyten. Es ist sehr wichtig, das Antigen (die Antigene) auch in einer Form zu verabreichen, die den Transport in die MHC II-Endosomen ermöglicht. Nur so kann zuverlässig eine Präsentation an MHC II erreicht werden. Bei einem gentechnischen Eingriff erfolgt dies in der Regel durch Manipulation des offenen Leserasters, so daß dem Leseraster eine Signalsequenz für dieses Kompartiment vorgeschaltet wird. Eine genetische Manipulation hat den zusätzlichen Vorteil, daß sie eine viel längere Halbwertszeit hat, als z.B. Oligonukleotide oder Peptide. Eine stabile Integration von Genen führt sogar zu einer permanenten Veränderung der Eigenschaft der Zielzellen.

Die entsprechenden Nukleinsäuren können dabei DNA, RNA, Oligonukleotide, Polynukleotide, Ribozyme, Peptidnukleinsäuren (PNA) sein.

Vorzugsweise besitzt die DNA Regulationselemente wie Enhancer, Promotoren, polyA-kodierende 3'-Enden zur Transkription der DNA in RNA, die RNA Regulationselemente zur Translation der RNA in Protein. Die Regulationselemente sorgen für eine effiziente Expression der Gene.

Die Herstellung der erfindungsgemäßen monoantigenen antigen-präsentierenden Zelle erfolgt zum Beispiel durch ex vivo oder in vivo Verfahren. Dabei wird vorzugsweise eine antigen-präsentierende Zelle ex vivo oder in vivo durch Behandlung mit Viren viralen Vektoren, bakteriellen Vektoren, Plasmiden, die durch Elektroporationstechniken, Iontophorese, ballistischen Methoden und/oder anderen Techniken zur Einschleusung von Molekülen in eine monoantigene antigen-präsentierende Zelle transformiert.

In einer weiteren Ausführungsform kann eine antigen-präsentierende Zelle oder eine monoantigene antigen-präsentierende Zelle durch Behandlung mit Viren, viralen Vektoren, bakteriellen Vektoren, Plasmiden, die durch Elektroporationstechniken, Iontophorese, ballistischen Methoden und/oder anderen Techniken zur Einschleusung von Molekülen in eine Zelle mit supprimierter Funktion co-stimulatorischer Rezeptoren transformiert werden oder die Expression co-stimulatorischer Rezeptoren durch Verhinderung von deren Expression oder die co-stimulatorischen Rezeptoren werden durch Reaktion mit affinen Strukturen an einer Stimulation von T-Zellen, die an die monoantigene antigen-präsentierende Zelle gebunden sind, gehindert.

Für die Unterdrückung der Co-Stimulation, die letztendlich ein Unterdrücken der Produktion eines oder mehrerer Proteine oder die Behinderung des Proteins oder der Proteine bedeutet, kommen verschiedene Strategien in Frage:

1. Antisense-Ansatz
2. Co-Suppression
3. Bindung des co-stimulatorischen Moleküls.

Zu 1.: In diesem Fall müssen Antisense-Nukleinsäuren in Kontakt mit der mRNA des co-stimulatorischen Moleküls kommen. Sie binden dann wahrscheinlich das Molekül und verhindern die Translation. Als Nukleinsäuren kommen eine große Bandbreite von Molekülen, wie RNAs, DNAs, PNAs, Ribozyme, in Frage. Auch hier würde ein gentechnischer Eingriff für die größte Halbwertszeit des Effekts sorgen.

Zu 2.: Es hat sich inzwischen herausgestellt, dass man die Produktion eines Genproduktes auch durch Integration einer möglichst homologen Sense-Gensequenz erreichen kann. Der Mechanismus ist noch völlig unbekannt.

Zu 3.: Die Bindung des co-stimulatorischen Moleküls z.B. durch spezifische Antikörper verhindert, daß dieses Molekül Kontakt mit dem avisierten Rezeptor auf einer T-Zelle aufnimmt und verhindert so die Aktivierung der T-Zelle. Die externe Zugabe solcher Bindemoleküle hat den Nachteil, dass sie auf alle Antigen-präsentierenden Zellen wirken und damit jede Immunreaktion verhindern. Um Immunreaktionen spezifisch zu behindern, haben wir ein Modell entworfen, bei dem die co-stimulatorischen Moleküle bereits in der Zelle, in einem intrazellulären Kompartiment gebunden werden. In einer Erweiterung dieses Modells soll dafür gesorgt werden, dass das Bindemolekül im intrazellulären Kompartiment zurückgehalten wird, so dass der co-stimulatorische Rezeptor erst gar nicht zur Plasmamembran gelangt. Hierfür sind Signalsequenzen bekannt, die dem offenen Leseraster des Bindemoleküls zugefügt werden müssen. Dieser intrazelluläre Ansatz lässt sich gut an isolierten Zellen durchführen. Auch hier ist ein gentechnischer Eingriff zu bevorzugen.

Die gewünschten Effekte können auch erreicht werden, wenn nur eines der beiden Ziele mit einem gentechnischen Eingriff vorgenommen wird. In diesem Fall können statt der Gene z.B. folgende anderen Moleküle eingesetzt werden:

1. Behinderung der Co-Stimulation durch

Nukleinsäuren (zumeist komplementär zur Zielsequenz) bei denen es sich z.B. um Oligonukleotide, Polynukleotide, Ribozyme, Peptidnukleinsäuren (PNAs) handeln kann,

Antikörper oder andere Moleküle, die die co-stimulatorischen Moleküle binden.

2. Antigen Kontaktierung durch

Proteine, Peptide, Peptidomimetica.

Es werden nach dem erfindungsgemäßen Verfahren insbesondere Moleküle wie Antikörper, Proteine, Peptide, Peptidomimetica, CTLA4, CD28, CD40L und/oder Bestandteile und/oder Kombinationen dieser Moleküle, die z.B. B7-1, B7-2, CD40 binden, welche eine in Gegenwart einer Antigenpräsentation stattfindende Co-Stimulation der T-Zelle behindert, mit der monoantigenen antigen-präsentierenden Zelle oder der antigen-präsentierenden Zelle in Kontakt gebracht.

Es kann vorteilhaft sein, die Moleküle mittels Vehikeln, wie Liposomen, Hydrogele, Zyklodextrine, biologisch abbaubare Nanokapseln, bio-adhäsive Mikrokugeln und/oder durch Elektroporationstechniken, Iontophorese, ballistische Methoden und/oder andere Techniken zur Einschleusung von Molekülen in die monoantigene antigen-präsentierende Zelle oder die antigen-präsentierende Zelle zu transferieren.

Nukleinsäuren können insbesondere durch Viren, virale Vektoren, bakterielle Vektoren, Plasmide, die durch Elektroporationstechniken, Iontophorese, ballistische Methoden und/oder andere Techniken zur Einschleusung von Molekülen in die monoantigene antigen-präsentierende Zelle oder die antigen-präsentierende Zelle transferiert werden.

Erfindungsgemäß beansprucht wird ein Arzneimittel, enthaltend mindestens eine erfindungsgemäße monoantigene antigen-präsentierende Zelle. Vorzugsweise ist das erfindungsgemäße Arzneimittel als Infusionslösung zur intravenösen oder intraperitonealen Applikation formuliert. Die Formulierung ist so gewählt, dass bei Verabreichung des Arzneimittels keine wesentliche Beeinträchtigung der Wirksamkeit der erfindungsgemäßen monoantigenen antigen-präsentierenden Zelle erfolgt.

So kommt als Infusionslösung vorzugsweise physiologische Kochsalzlösung in Betracht. Grundsätzlich sind auch andere Lösungen, die einen pH-Wert von 5,5 bis 8,5 aufweisen, geeignet. Auch Serum, beispielsweise humanes Serum,

authologes Serum oder Serum anderer Species, Lösungen mit Plasmaersatzstoffen, wie Polyvinylpyrrolidon, kommen in Betracht. Typischerweise sollen 0,5 ml bis 500 ml appliziert werden. Diese Mengen sind selbstverständlich nicht absolut, sondern können vom Fachmann, je nach Bedingungen und Anforderungen, variiert und an die spezifischen Bedürfnisse eines Patienten angepasst werden.

Die erfindungsgemäße monoantigene antigen-präsentierende Zelle kann insbesondere zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung von ungewollten Immunreaktionen, wie Autoimmunerkrankungen und Allergien oder gewollt hervorgerufenen Immunreaktionen, wie bei Immunisierungen verwendet werden.

Weiterhin kann die erfindungsgemäße monoantigene antigen-präsentierende Zelle zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung von Immunreaktionen gegen allologe und/oder xenologe Gewebsmerkmale verwendet werden.

Erfindungsgemäß beansprucht werden insbesondere Verwendungen, bei denen die zu behandelnden Immunreaktionen in Verbindung mit Antigenen oder deren Gensequenzen und/oder Teilen davon stehen und ausgewählt sind aus der Gruppe bestehend aus

- Enzymen, deren Gensequenzen und/oder Teilsequenzen, insbesondere Glutamic acid decarboxylase (GAD), Rezeptor-Typ Protein Tyrosin Phosphatase IA-2Beta, Antigen: $H^+K^+ATPase$, U1RNP, Transglutaminase, Argininosuccinatlyase (ASL), Tyrosinase-related protein-2, Thyroid Peroxidase, Faktor VIII, Faktor IX;
- Rezeptoren, deren Gensequenzen und/oder Teilsequenzen, insbesondere Acetylcholinrezeptor vom Nicotintyp, β_1 -adrenerger-Rezeptor, α_1 -adrenerger-Rezeptor, Angiotensin-2-AT1-Rezeptor, Glutamat-Rezeptor, Thyrotropin-stimulierendes Hormon (TSH)-Rezeptor, LFA-1, HLA-B27, Epididymal Protein DE, Zona Pellucida (ZP)-3 Glycoprotein, Zona Pelluci-

da (ZP)-4 Glycoprotein, Follicle-Stimulating Hormone (FSH) Rezeptor, Sperm Immunogen SP-10 oder Sperm Protein SP-10;

- Hormone oder Botenstoffe, deren Gensequenzen und/oder Teilsequenzen, insbesondere Insulin, Thyroglobulin, Follicle-Stimulating Hormone (FSH), Prostaglandin F2 alpha, Gonadotropin-Releasing Hormone (GnRH), Oestradiol-17beta, Oestrogen, Luteinizing Hormon (LH) Rezeptor, Inhibin, Testosteron, Androgen, Chorionic Gonadotrophin (CG), Interleukine, Interferone, Cytokine, Chemokine, Bone Morphogenetic Factors, β -Interferon, Estradiol;
- Strukturproteine, deren Gensequenzen und/oder Teilsequenzen, insbesondere Myelin Basic Protein (MBP), Proteolipid protein (PLP), Myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG), α -Fodrin, Nicht-erythroides α -Spectrin, Beta-Amyloid Precursor Protein (beta-APP), Typ 2 Kollagen, Sperm Plasma Membran Protein PH-20;
- Antigene, deren Gensequenzen und/oder Teilsequenzen, insbesondere CENP-A Autoantigen, Beta2GP-I, ribosomales P Protein, Ro/SSA, La/SSB, Sm/RNP, Sm, Scl-70, Jo-1, BCOADC-E2, Albumin, Glucagon, Inselzellantigene, Retinal S Ag;
- Allergene, die eine IgE-Antwort auslösen, deren Gensequenzen und/oder Teilsequenzen, insbesondere Der f 1, Der f 2, Der f 3, Der p 1, Der p 2, Der p 3, Der p 4, Der p 5, Der p 8, Eur m 1, Lep d 2, Fel d 1, Can f 1, Can f 2, Mus m 1, Rat n 1, Bla g 1, Bla g 2, Bla g 4, Bla g 5, Per a 1, Bienengift Phospholipase A2 (PLA2), Group V major allergen Phl p 5b von Timothy Grass Pollen, Hom s 1.

Weiterhin wird erfindungsgemäß beansprucht eine Verwendung bei der die zu behandelnden Immunreaktionen in Verbindung mit allologenen und/oder xenologischen Gewebsmerkmalen, deren Gensequenzen und/oder Teilsequenzen, insbesondere MHC I, MHC II, Rhesus Faktor stehen.

Entwicklung einer Gentherapie

Das hier vorgestellte Verfahren zur Reduzierung von Immunantworten z.B. zur Behandlung von Autoimmunerkrankungen mit klar definiertem Autoantikörperprofil basiert auf der gentechnischen Manipulation von bestimmten Blutzellen vorzugsweise außerhalb des Körpers, die dann anschließend wieder in den Organismus zurückgeführt werden. Ziel dieser Behandlung ist unter anderem das spezifische Abschalten einer chronischen, durch das Immunsystem getriebenen Produktion von Autoantikörpern, welche die Krankheit auslösen.

Anwendungsgebiete der Gentherapie

Das Verfahren zur spezifischen Abschaltung von Immunreaktionen ist immer dort sinnvoll, wo ein oder mehrere molekular definierte Targets (Antigene, Autoantigene) bekannt sind. Diese können beispielsweise mit einer Autoimmunerkrankung oder Allergie assoziiert seien.

Z.B. handelt es sich dabei um Krankheiten mit Autoantikörper-vermittelten Autoimmunreaktionen, d.h. um Krankheiten, bei denen die "Bindungsstrukturen" dieser Autoantikörper (Autoantigene, Targets) bekannt sind und pathogenetische Bedeutung haben.

Beispiele für Krankheiten mit bekannten, die Autoantikörper-bindenden molekularen Strukturen (Epitope) sind:

- Myasthenia gravis (Autoantikörper gegen den Acetylcholinrezeptor)
- Morbus Basedow (Autoantikörper gegen den TSH-Rezeptor der Schilddrüse)
- Dilatative Cardiomyopathie (DCM, Autoantikörper gegen den β_1 -adrenergen Rezeptor der Herzmuskelzellen)

- bestimmte Formen des insulinabhängigen Diabetes (Autoantikörper gegen Insulin)
- bestimmte Formen des malignen Bluthochdrucks (Autoantikörper gegen den Angiotensin- und/oder $\alpha 1$ -adrenerger-Rezeptor).

Behandlung mit genmanipulierten patienteneigenen Blutzellen: Prinzip der vorgeschlagenen Gentherapie

Innerhalb des Immunsystems spielen die Antikörper als Abwehrmoleküle ("humorale Immunreaktion") eine wichtige Rolle. Sie werden von ausgereiften B-Lymphozyten produziert. Die Induktion und Produktion der Antikörper erfolgt allerdings nicht losgelöst von den restlichen Zellen des Immunsystems; vielmehr wird diese humorale Immunreaktion von anderen Zellen des Immunsystems gesteuert. Die Immunreaktion lässt sich nicht aufrechterhalten ohne die Hilfe und Vermittlung von Antigen-präsentierenden Zellen und T-Helfer-Lymphozyten. Die molekularen Mechanismen der Interaktion - des Zell-Zell-Kontakts - von Antigen-präsentierenden Zellen mit den T-Helfer-Lymphozyten ist auf Rezeptorebene bis ins Detail bekannt.

Neben dem zu präsentierenden Antigen sind auf der Zelloberfläche verschiedene Rezeptoren und Hilfsrezeptoren am Zell-Zell-Kontakt und der Zellaktivierung beteiligt. Ein essentielles Molekül der interzellulären Wechselwirkung bei der Antigenpräsentation (Kontakt von Antigen-präsentierenden Zellen mit den T-Helfer-Lymphozyten) sind costimulierende Rezeptoren mit den Bezeichnungen B7-1 und B7-2. Auch CD40 spielt bei dieser Signaltransduktion eine Rolle.

Die Funktionen von B7 und CD40 sind Inhalt zahlreicher Publikationen (Daikh *et al.* 1997; Greenfield *et al.* 1998; Johnson-Leger *et al.* 1998; McAdam *et al.* 1998; Vyth-Dreese *et al.* 1995) und werden auch umfangreich in Lehrbüchern abgehandelt (s. z.B. Janeway and Travers 1997).

Das konzipierte Verfahren beruht auf zwei parallelen Eingriffen an patienteneigenen Antigen-präsentierenden Zellen. Die Eingriffe erfolgen mittels geeigneter Sonden und bewirken

- die Abschaltung von B7 und damit die Verhinderung der Ausbildung des Moleküls auf der Oberfläche der Antigen-präsentierenden Zellen und/oder die Abschaltung von CD40 und
- gleichzeitig eine starke Präsentation des Autoantigens auf den Antigen-präsentierenden Zellen.

Sollte die Manipulation der Zellen, die z.B. Monozyten sind, *in vitro* erfolgen, werden die Zellen in die Blutbahn des Spenders zurückgegeben. Die genmanipulierten Monozyten schalten nunmehr die im Organismus befindlichen entsprechenden T-Helfer-Lymphozyten ab. Die genmanipulierten Zellen treten dabei unmittelbar in Konkurrenz zu den bereits im Organismus (vorzugsweise Blutbahn und Lymphsystem) vorhandenen Autoantigen-präsentierenden Monozyten, die allerdings B7 auf der Zelloberfläche tragen und normalerweise die T-Helfer-Lymphozyten und damit unter anderem die Antikörperproduktion aktivieren.

Behandlung von Autoimmunerkrankungen, Allergien und Transplantationen: Stand der Technik

Kausaltherapien zur Behandlung von Autoimmunerkrankungen und Allergien existieren nicht. Von wenigen Ausnahmen abgesehen (extrakorporale Elimination der Antikörper aus dem Blut der Patienten bzw. Plasmapherese), erfolgt die Behandlung von Autoimmunerkrankungen und Allergien medikamentös durch eine Hemmung von Reaktionen des Immunsystems.

Nach wie vor am gebräuchlichsten ist die medikamentöse Behandlung von Autoimmunerkrankungen, Allergien und Transplantationen mit immunsuppres-

siven Präparaten wie Cortison und dessen Abkömmlingen, Cyclosporin, Beta-Interferon oder Zytostatika (Methothrexat). Desweiteren werden Antikörper, Antagonisten und Oligonukleotide gegen verschiedene Signalkomponenten des Immunsystems mit dem Zweck erprobt, die Aktivierung von T-Zellen zu verhindern. Solche Arzneimittel sind bestenfalls selektiv, nie aber spezifisch gegen die falsch programmierten Autoimmunreaktionen gerichtet. Immunsuppressiva haben daher auf wichtige, notwendige und nützliche Teile des Immunsystems eine negative Wirkung; aus diesem Grund und ihrer Nebenwirkungen wegen ist ihr Einsatz begrenzt.

Von den immunsuppressiven Therapien unterscheidet sich das vorgelegte Konzept einer Gentherapie zur Reduktion von spezifischen Immunreaktionen grundlegend. Es wird eine spezifische Abschaltung fehlgeleiteter immunologischer Reaktionen durch gentechnisch umprogrammierte patienteneigene Blutzellen durchgeführt.

Die aufgezeigte Methodik ist als allgemein gültiges Konzept zur Reduzierung von Immunantworten gedacht. Es sollte mit diesem Grundkonzept möglich sein jede Immunreaktion des anpassungsfähigen Immunsystems wieder abzustellen. Außerdem können nach belieben solche Immunreaktionen hervorgerufen und dann wieder abgestellt werden.

Somatische Gentherapie

Grundlagen

Als Hilfsmittel für den Gentransfer werden hauptsächlich retrovirale (Hunt 1987; Porter 1996) oder adenovirus-assoziierte Vektoren eingesetzt (Bertran 1996), liposomen-vermittelter Gentransfer spielt nur eine untergeordnete Rolle.

Einteilung der Retroviren

Retroviren sind einzelsträngige, umhüllte RNA Viren. Die Familie der Retroviridae wird in drei Unterfamilien eingeteilt: Onkoviren, Lentiviren und Spumavi-

ren (Fields 1996). Zu den Lentiviren gehören HIV-1 und HIV-2, zu den Spumaviren das Simian Foamy Virus. Die Gruppe der Onkoviren wird in 5 Genera unterteilt (Tabelle 1).

Tab. 1: Einteilung der Onkoviren und ihre wichtigsten Vertreter bei Menschen und Tieren

Genus	Mensch	Tier
B-Typ Viren	HervK Familie	Maus Mamma Tumor Virus (MMTV)
C-Typ Viren (Säuger)	Erv-3 S71 Familie	Moloney Maus Leukämie Virus (MoMuLV) Harvey Maus Sarkom Virus (HaMSV) felines Leukämie Virus (FeLV) Gibbon Ape Leukämie Virus (GALV) Affen Sarkom Virus (SSV) aviäres Leukose Virus (ALV) Rous Sarkom Virus (RSV) Rous assoziiertes Virus (RAV 1-50)
ALV-related (C-Typ Viren)		
D-Typ Viren		Mason Pfitzer Affen Virus
HTLV/BLV Gruppe	humane T- Zell Leukämie Viren (HTLV1/HTLV2)	Rinder Leukämie Virus (BLV)

Genereller Aufbau der Retroviren

Elektronenmikroskopische Bilder zeigen, daß Retroviren umhüllte Partikel mit einer Grösse von etwa 100 nm sind. Das Capsid ist von einer Membran umgeben, in die nach außen weisende Hüllproteine (env) eingelagert sind. Innen ist die Membran mit einer Schicht von Matrixproteinen (MA) versehen. Im Innern des Partikels befindet sich das Nucleocapsid, welches aus Capsidproteinen (CA)

aufgebaut ist. Matrixprotein und Capsidprotein gehören zu den sogenannten gruppenspezifischen Antigenen (gag). Innerhalb des Capsids befinden sich zwei Moleküle einzelsträngige RNA sowie die Enzyme Reverse Transkriptase (RT), Integrase (IN) (durch die als pol bezeichneten Sequenzen kodiert) und Protease (PR) (durch die als pro bezeichneten Sequenzen kodiert) (Fields 1996).

Das Genom der Retroviren besteht aus zwei identischen Einzelstrang-RNAs von 7 - 10 kb Länge.

Die RNA beginnt mit der m⁷GPPP Cap Struktur, die wichtig für die Translation der Strukturproteine ist, und endet mit der ca. 200 Basen langen Poly(A) Sequenz. Zwischen Cap Struktur und Poly(A) Sequenz findet man regulatorische Sequenzen, unter anderem den Spleißdonor, dann folgen die für die gag-, pro- und pol-Proteine kodierenden Sequenzen, der Spleißakzeptor und die kodierende Sequenz für das env Gen.

Die einfachen Retroviren, wie z.B. die C-Typ Viren, benötigen nur diese Proteine für ihren Lebenszyklus. Komplexere Viren, wie z.B. die Lentiviren, enthalten noch weitere Gene, entweder durch Verschiebung der Leserahmen oder durch weitere Sequenzen zwischen der env-Region und den 3' regulatorischen Sequenzen.

Maus Leukämie Viren

Das für den Gentransfer am häufigsten benutzte Virus, das amphotrope Maus Leukämie Virus (MuLV), gehört zur Klasse der C-Typ Viren. Murine Leukämie Viren werden anhand ihrer Rezeptornutzung und damit ihres Wirtsbereiches weiter unterteilt (Tab. 2).

Tab.2: Einteilung der murinen Leukämie Viren

Klasse	Wirtsbereich	Rezeptor	Funktion
amphotrop	alle Mammalia	Pit-2 (ram-1)	PO ₄ ³⁻ Trans- porter
ecotrop	Maus	mCat	AS Transpor- ter
polytrop	alle Mammalia	?	?
xenotrop	alle Mammalia au- ßer Maus	?	?
MCF	Maus	?	?
10A1	alle Mammalia	Pit-1 (Glv-1) und Pit-2 (ram-1)	

Zellen, die mit den Viren einer Gruppe infiziert sind, können nicht von Viren derselben Klasse überinfiziert werden, da die zellulären Rezeptoren bereits von den env Proteinen dieses Virus besetzt sind. Dieses Phänomen wird Interferenz genannt. Die Zellen können jedoch mit Viren einer anderen Klasse infiziert werden.

Aufbau des MuLV -Genoms

Anschließend an die 5' Capping Region befindet sich die 5' R Region, gefolgt von der U5 Region, der Primer Binding Site (PBS), dem Leader, den Sequenzen für die viralen Proteine, dem Polypurintrakt, der U3 Region, der 3' R Region und der Poly A Sequenz.

Direkt an die Capping Struktur anschließend und vor dem Poly A Strang befinden sich jeweils die beiden identischen R Regionen. Sie sind ca. 60 Basenpaare lang und wichtig für die reverse Transkription.

Die am 5' Ende anschließende U5 Region ist die erste transkribierte Region bei der reversen Transkription und enthält wichtige Sequenzen für die Initiation

der Transkription. Sie ist ca. 75 Basen lang und wird zum 3' Ende der 5' Long Terminal Repeats (LTR) des Provirus.

Die Primerbinding Site ist 18 Nucleotide lang. Hier wird ein Molekül tRNA als Primer gebunden.

Die Leader Sequenz ist ca. 475 Basen lang und enthält die Splice Donor Sequenzen. Außerdem ist das Verpackungssignal hier lokalisiert. Es bewirkt beim Zusammenbau der Virionen die Verpackung der genomischen RNA in die Virionen, während andere RNA nicht verpackt wird.

Daran schließen sich die Sequenzen für die gag, pro und pol Gene an, gefolgt vom Splice Akzeptor und den Sequenzen für die env Gene.

An die env Sequenz schließt sich direkt vor der U3 Region der Polypurin Bereich an. Hier ist die Initiationsstelle für die Plus Strang Synthese lokalisiert.

Die U3 Region ist ca. 500 Basen lang und wird der 5' Bereich der LTR im Provirus. Sie enthält alle für die Transkription der viralen Proteine erforderlichen Sequenzen, wie z. B. Bindungsstellen für verschiedene Transkriptionsfaktoren oder die TATA Box. Zelllinien spezifische Regulation der Expression z. B. wird von der U3 Region codiert.

Die U3 Region wird von der 3' R Region gefolgt, sowie dem Polyadenylierungs Signal und der 200 Nucleotid langen Poly A Sequenz.

Aufbau der MuLVs

Die Matrix-, Capsid- und Nucleoproteine werden von zwei gemeinsamen Polypeptid-Vorläufern synthetisiert. Das Pr180^{gag-pol} enthält neben den gag Proteinen auch die pol Domäne, das Pr65^{gag} enthält nur die gag Proteine. Diese Vorläuferproteine werden von der viralen Protease (PR) sequentiell in die reifen Proteine gespalten: Matrixprotein (p15), Capsidprotein (p30) und Nucleoprotein (p10); Protease (p14), Reverse Transcriptase (p80) und Integrase (p46).

Das Matrixprotein ist über aminoterminal angefügte Myristinsäurereste mit der Lipidmembran am engsten assoziiert. Das Capsid oder Core ist aus dem hydrophoben Capsidprotein aufgebaut. Das kleine basische Nucleoprotein liegt innerhalb des Cores. Werden diese Proteine in eukaryontischen Zellen expri-

miert, lagern sie sich dort in die Zytoplasmamembran und generieren nach Ausknospung fast normal aussehende Virionen. Die gag Proteine liegen im ersten Leserahmen des Virusgenom und werden in der Zelle in großen Mengen synthetisiert, da sie sowohl vom Pr180^{gag-pol} als auch vom Pr65^{gag} generiert werden (Fields 1996).

Die folgenden pro und pol Gene, die für die enzymatischen Aktivitäten verantwortlich sind, liegen im nächsten Leserahmen und werden in geringeren Mengen hergestellt (nur vom Pr180^{gag-pol}).

Die Protease ist verantwortlich für die Aufspaltung der gag und pol Polyprotein-Vorläufer in die reifen Proteine.

Die reverse Transkriptase enthält die DNA Polymerase-Aktivität und eine RNase H-Aktivität, sie besitzt jedoch keine "proof reading" Aktivität. Reverse Transkriptase gehört zu den am stärksten konservierten Bereichen des Retrovirusgenoms. Man findet nicht nur Übereinstimmung innerhalb der Retrovirus Familie, sondern bestimmte Bereiche sind auch bei genetisch weit entfernten Viren, wie z.B. den Hepadnaviren (doppelsträngige DNA-Viren) und dem Blumenkohl-Mosaic Virus zu finden.

Die Integrase ist das Enzym, das die provirale DNA in das Genom der Wirtszelle einfügt.

Die env Gene haben einen eigenen Leserahmen und werden über einen Spleißakzeptor transkribiert. Sie werden ebenfalls als Polyprotein-Vorläufer transkribiert (Pr80^{env}), aber durch eine zelluläre Protease gespalten: Transmembran Region (p15E) und externes Glykoprotein (gp70).

Das env Protein besteht aus zwei Polypeptidketten, die durch Disulfid -Brücken miteinander verbunden sind. Diese Ketten werden als gemeinsamer Vorläufer synthetisiert; der aminoterminaler Teil ergibt die externe Polypeptidkette (SU), der carboxyterminale Teil die Transmembranregion (TM). Das SU Protein ist glykosyliert und für die Interaktion mit dem Rezeptor zuständig; das TM Protein ist nicht glykosyliert und sorgt für die Verankerung der Proteine in der Membran. Wahrscheinlich ist er auch für die Dimerisierung der env Moleküle verantwortlich.

Da die Bindung zwischen dem SU und dem TM Protein nicht besonders fest ist, geht das SU Protein häufig "verloren". Dies bedingt unter anderem die mangelnde Stabilität infektiöser Viren während der Ultrazentrifugation und die große Anzahl an infektionsdefekten Partikeln.

Der retrovirale Lebenszyklus der MuLVs

Der Replikationszyklus des murinen Leukämie Virus entspricht dem allgemeinen Schema der Retroviren und unterteilt sich in folgende Schritte:

- Anheftung an den Rezeptor und Zelleintritt
- Reverse Transkription
- Kerntransport und Integration
- Synthese viraler RNA und Proteine
- Ausknospung und Reifung der Virionen

Anheftung an den Rezeptor und Zelleintritt

Die Infektion einer Zelle erfolgt durch die spezifische Anlagerung des Virus an seinen Rezeptor auf der Zelloberfläche und die anschließende Aufnahme des Virus in die Zelle. Nur Zellen, die diesen Rezeptor exprimieren, können infiziert werden.

Die Interaktion zwischen dem zellulären Rezeptor und dem externen viralen Hüllprotein (SU) bewirkt eine Konformationsänderung bei letzterem und ermöglicht die Fusion mit der Zellmembran durch die Transmembrandomäne des Virus. Die Aufnahme der Virionen erfolgt entweder durch pH abhängige Fusion (ecotropes Virus) oder durch Endozytose (amphotropes Virus).

Reverse Transkription

Im Cytoplasma der Zelle erfolgt das Uncoating der Viren; dadurch wird die virale RNA freigesetzt und die Reverse Transkriptase aktiviert. Das Capsid verbleibt jedoch in enger Assoziation mit der viralen RNA und ist notwendig für die korrekte Transkription der viralen RNA in DNA.

Ausgehend von dem tRNA Primer, der nahe dem 5'Ende an der Primerbindungsstelle (PB) sitzt, wird zunächst der Minus-DNA-Strang synthetisiert. Es

wird die 5' gelegene U5 und R-Region transkribiert (strong stop DNA), wobei gleichzeitig durch die RNase H Aktivität der Reversen Transcriptase die RNA Matritze abgebaut wird. Die so freigewordene DNA "springt" an das 3' Ende der viralen RNA und es erfolgt eine Anlagerung der neu synthetisierten R-Region an die dort vorhandene R-Region. Ausgehend von dieser Matritze wird die restliche virale RNA in DNA transkribiert und bis auf den RNase H resistenten Polypurin Bereich vor der U3 Region abgebaut. Dieser Bereich dient am bereits synthetisierten Minus-DNA-Strang als Matritze für die Synthese des Plus-DNA-Stranges, dessen 3' Ende als erstes transkribiert wird. Dann werden die verbleibenden RNA Reste abgebaut und die Primerbindungsstelle des Plus-Stranges kann an die Primerbindungsstelle des Minus-Stranges binden und die Synthese des Plus-Stranges kann vollständig ablaufen. Als letzter Schritt werden beide DNA Stränge vervollständigt. Die neu synthetisierte DNA enthält an beiden Seiten die Long Terminal Repeats (LTR).

Kerntransport und Integration

Die im Cytoplasma neu synthetisierte virale DNA wandert als Präintegrationskomplex in den Kern und lagert sich dort an die zelluläre DNA an. MuLV können nur sich teilende Zellen infizieren, da diese eine aufgelöste Zellmembran haben. Sie besitzen kein Kerntransportsignal oder Protein (wie z.B. HIV), daß den Kerntransport bewirken könnte. Der Präintegrationskomplex ist auch zu groß, um durch Kernporen zu diffundieren. Die virale DNA liegt in linearer Form vor. Die viruseigene Integrase spaltet die zelluläre DNA an einer beliebigen Stelle und erzeugt überhängende Enden von 6 Basenpaaren. Die 3' Enden der viralen DNA werden mit einem Strang der zellulären DNA ligiert; vorher werden jeweils 2 Basen an den 3' Enden der viralen DNA entfernt. Die fehlenden Sequenzen im zweiten Strang werden durch das zelleigene Reparatursystem aufgefüllt, wobei auch die beiden überzähligen Basen am 5' Ende der viralen DNA entfernt werden.

Retrovirale Vektoren

Retroviren gehören zu den nicht lytischen Viren, haben ein einfaches Genom, sind gut charakterisiert, integrieren stabil in das Genom der infizierten Zelle und können dort dauerhaft das inserierte Gen exprimieren- alles Gründe, um sie für gentherapeutische Ansätze attraktiv zu machen.

Für die Transduktion von humanen Zellen werden Vektoren mit amphotropem env eingesetzt oder Pseudotypvektoren mit dem env anderer Viren. Es wird an der Entwicklung zelltypspezifischer Vektoren gearbeitet, entweder durch Wahl einer geeigneten LTR (Hunt 1987), eines besonderen Hüllproteins oder durch Einbringen von Antikörpern oder Rezeptoren in die Virushülle.

Aufbau

Retrovirale Vektoren werden auf der Basis von Retroviren hergestellt. Um die Bildung von replikationskompetenten Viren zu verhindern, werden die viralen Gene deletiert. Anstelle dieser wird zwischen die LTRs das zu exprimierende Gen mit den nötigen Regulationssequenzen kloniert und mit dem Verpackungssignal versehen. Die Verpackung der Vektoren erfolgt in speziellen Verpackungszelllinien, die alle zur Verpackung nötigen Proteine bereitstellen.

Die zu transferierende DNA wird durch die Verpackungskapazität der Virionen begrenzt. Retrovirale Vektoren können bis 9 kb Fremd DNA übertragen.

Durch Wahl eines geeigneten LTR oder eines zusätzlichen Promotors wird versucht, eine möglichst hohe Expression des transferierten Gens in der gewünschten Zielzelle zu erhalten. Durch verschiedene Strategien können mehrere Gene von einem Vektor aus kodiert werden.

Verpackungszellen für retrovirale Vektoren

Da bei retroviralen Vektoren alle viralen Gene deletiert wurden, müssen die für die Replikation benötigten Proteine von geeigneten Verpackungszellen bereit gestellt werden.

Die zur Zeit benutzten Verpackungszellen enthalten ein Konstrukt, das für die gag pol Gene kodiert, und ein weiteres, das für die Hüllproteine kodiert (Danos 1988). Sie sind stabil in das Genom der Zellen integriert. Die Konstrukte ent-

halten kein Verpackungssignal, so daß nur leere Virionen gebildet werden. Erst wenn Vektor DNA in den Zellen vorliegt, entstehen RNA haltige Viren.

Die Benutzung von zwei verschiedenen Konstrukten zur Expression von gag, pol und env soll die Gefahr der Bildung von replikationskompetenten Viren vermindern. Es sind mindestens drei Rekombinationsereignisse erforderlich, bevor ein replikationskompetentes Virus (RCR) entstehen kann. Trotzdem müssen Verpackungszellen für klinische Anwendungen ständig auf RCRs überprüft werden.

Ausführungsbeispiel

Methoden

Die grundsätzlichen Methoden der Molekularbiologie sind in "Current Protocols" (Fred M. Ausubel 1999; John E. Coligan 1999; Juan S. Bonifacino 1999) offenbart. Hierauf wird ausdrücklich Bezug genommen.

Zellkultur

Alle Zelllinien wurden in Brutschränken bei 37°C und 5 % CO₂ kultiviert.

Isolation von Monozyten

Folgende Methoden wurden verwandt, um humane Blutmonozyten oder solche aus Mäusen aufzureinigen. Dem Fachmann sind noch weitere Methoden an sich bekannt.

Isolierung und Kultur peripherer Blutmonozyten

Medium 1: Dulbecco's PBS ohne (Ca und Mg)

Medium 2: RPMI 1640
10% fetales Kälberserum

Medium 3: RPMI 1640, serumfrei

Periphere Blutmonozyten wurden aus *buffy coats* oder Mäuseblut vorzugsweise durch Dichtezentrifugation über ein Lymphozytentrennmedium und anschließende selektive Adhäsion isoliert.

Buffy coats, präpariert aus ca. 400 ml Zitratblut von gesunden Spendern, wurden von einer lokalen Blutspende erhalten. Frisch präparierte *buffy coats* wurden jeweils mit Medium 1 auf ca. 120 ml aufgefüllt. 30 bis 35 ml der Zellsuspension wurden in sterilen 50ml-Polypropylenröhrchen mit 15 ml Ficoll-Paque ($d = 1,077 \text{ mg/ml}$) vorsichtig mit einer Spritze unterschichtet und bei $400 \times g$, 30 min, 24°C zentrifugiert. Die in der Interphase enthaltenen Lymphozyten/Monozyten wurden zweimal bei $200 \times g$, 15 min, 20°C gewaschen. Dann wurden die Zellen mit einer Dichte von $5 \times 10^6/\text{ml}$ bis $2 \times 10^7/\text{ml}$ in sterile, gelatinebeschichtete Zellkulturschalen in Medium 2 ausgesät. Nach zweistündiger Inkubation bei 37°C konnten nicht adhärente Zellen durch dreimaliges, gleichmäßiges Waschen mit Medium 3 entfernt werden. Die Monozyten wurden dann in Medium 2 bei 37°C , 5% CO_2 kultiviert. Das Mäuseblut wurde in gleicher Weise behandelt.

Der Buffy coat bzw. das Mäuseblut wurde 1:4 mit PBS ohne (Ca und Mg) verdünnt, 15 Minuten bei $100 \times g$ zentrifugiert. Der obere gelbliche Teil (Plasma) enthält hauptsächlich Thrombozyten. Er wird vorsichtig abgenommen und verworfen. Der Rest wird mit PBS ohne Ca & Mg auf ca. 120 ml verdünnt. Die Lösung wird auf vier Falcontubes mit jeweils 15 ml Ficoll ($d = 1,077 \text{ mg/ml}$) überschichtet. Dann wird 20 Minuten bei $700 \times g$ ohne Bremse zentrifugiert. Die Interphase (milchiger Ring) wird abgesaugt (Lymphozyten, Monozyten, Thrombozyten) und zweimal gewaschen. Das Pellet (Erythrozyten, Granulozyten) wird verworfen.

Die Monozyten werden dann durch Adhärenz an gelatinierte Plastikgefäße isoliert, da die anderen Zelltypen beim waschen entfernt werden. Hierzu wurde die Interphase zwei Stunden in den gelatinierten Plastikgefäßen inkubiert.

Virusproduktion

Für transiente Virusproduktion wurden die Zellen unter Verwendung der Ca-PO₄-Methode transfiziert und die Überstände an drei aufeinanderfolgenden Tagen abgesammelt.

Bei stabilen Producer Linien wurden die Zellen konfluent ausgesät und das Medium nach 6 h gewechselt. Nach 16 h wurden die Überstände abgesammelt und durch einen 0,8 µm Filter filtriert. Der Virusüberstand von amphotropen Verpackungslinien wurde direkt eingesetzt.

Virusanreicherung

Zur Virusanreicherung wurden die Überstände der virusproduzierenden Zellen abgesammelt und durch einen 0,8 µm Filter filtriert. Anschließend wurden sie in ein Zentrifugationsröhrchen überführt und bei 100.000 g und 5°C 2 h abzentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und das pelletierte Virus in wenig DMEM-Medium mit 2 % BSA aufgenommen. Die konzentrierten Viren wurden entweder direkt in Tests eingesetzt oder bei -80°C eingefroren.

Zur Optimierung wurde in Zentrifugationsröhrchen 5 ml einer 15% Sucroselösung vorgelegt und diese mit dem Zellkulturüberstand überschichtet. Dann wurde wie oben beschrieben zentrifugiert.

Für Westernblot-Analysen wurde der Überstand auf zwei Röhrchen aufgeteilt und zentrifugiert. Eines der Virus-Pellets wurde in Medium aufgenommen zur Titerbestimmung, das andere wurde in der gleichen Menge Virus-Lysepuffer aufgenommen und bis zur Verwendung bei -80°C eingefroren.

Virustiterbestimmung

a.) GTU

Je 5×10^3 SC-1 Fibroblasten wurden in 1 ml Medium in die Well einer 24 Well Platte ausplattiert. Nach 4 Stunden Inkubation wurde das Medium entfernt, durch 1 ml einer Virusverdünnung (1:5 Verdünnungsschritte, dreifach Ansatz) ersetzt und weitere 16 h inkubiert. Die Expression der zusätzlichen genetischen Informationen wurde im FACS oder per RT-PCR quantifiziert. Es wurden die Klone der Verdünnungsstufe ausgezählt, die 1 - 6 Klone pro Well enthielt.

b.) Verdünnung der infizierten Zellen

Je 1×10^6 SC-1 Fibroblasten wurden in 3 ml in die Wells einer 6-Well Platte ausplattiert. Nach 4 Stunden Inkubation wurde das Medium entfernt, durch 2 ml einer Virusverdünnung ersetzt und weitere 16 h inkubiert. Die Zellen wurden trypsinisiert und in Verdünnungen von 10^2 , 3×10^2 bis 1×10^5 Zellen/Well in 4 ml Medium ausplattiert. Es wurden je zwei Well pro Verdünnung angesetzt. Die Expression der zusätzlichen genetischen Informationen wurde im FACS oder per RT-PCR quantifiziert. Es wurden die Klone der Verdünnungsstufe ausgezählt, die 1 - 6 Klone pro Well enthielt.

Die Klonierungseffizienz berechnete sich aus den Klonen der Klonierungskontrolle:

Der Virustiter berechnete sich aus den Klonen der einzelnen Virusverdünnung, der Verdünnungsstufe und der Klonierungseffizienz.

Zur Titerbestimmung wurden nur Verdünnungen verwendet, in denen die Anzahl der Klone linear mit den Verdünnungen anstieg.

Verwendete therapeutische Gene

Als Genfähe diente ein amphotropes, murines Leukämievirus. Die in den Versuchen verwendeten Gene bezwecken einerseits die Reduktion der an der Zelloberfläche erscheinenden B7- und/oder CD40-Moleküle und sollen zusätzlich für die Expression eines Antigens sorgen. Dazu werden zu Beginn CTLA4Ig zur Unterdrückung von B7 und/oder CD40-Antisense-cDNA und ein Antigen verwendet. Bei dem Antigen handelt es sich bei humanen Monozyten um das C-Fragment des Tetanustoxins. Bei den Mäusemonozyten um Ovalbumin. CTLA4Ig ist ein Fusionsprotein aus dem Fc-Teil eines Antikörpers und dem Teil von CTLA4, der an B7 bindet. Es ist gezeigt worden, daß dieses Molekül sehr effektiv beide B7 (1 und 2)- Moleküle bindet und auch neutralisieren kann (Linsley, et al.; Patent; 1993).

Da Menschen gegen Tetanus geimpft werden, kann in humanem Blut eine starke Reaktion gegen Fragmente des Tetanustoxins (z.B. das C-Fragment)

auch *ex vivo* beobachtet werden. Dies wurde genutzt, um die *ex vivo* T-Zellproliferation zu beobachten.

Die Mäuse wiederum können gegen Ovalbumin geimpft werden. Danach kann die Reduktion der Immunantwort gegen Ovalbumin beobachtet werden.

Als Promotor wurde der CMV-Promotor (Boshart *et al.* 1985; Nelson *et al.* 1987) verwendet. Die Gene waren durch IRES-Sequenzen transkriptional gekoppelt (Hildinger *et al.* 1999).

Transfektion der Monozyten

Hierfür wurde der Überstand der Verpackungszelllinie verwendet. Mit diesem wurden die Monozyten inkubiert.

Ergebnisse mit humanen Monozyten, *in vitro*

Die Buffy Coats wurden vorweg auf ihre Reaktivität gegen Tetanustoxin getestet. Der Versuchsansatz enthält Tests, mit Monozyten und T-Lymphozyten. Die Monozyten wurden

1. nicht genetisch verändert;
2. mit einem Retrovirus behandelt, der keine therapeutischen Gene enthält;
3. mit einem Retrovirus behandelt, der mit der C-Fragment-Tetanustoxin-cDNA versehen ist;
4. mit einem Retrovirus behandelt, der mit der C-Fragment-Tetanustoxin-cDNA und der CTLA4Ig-cDNA versehen ist;
5. mit einem Retrovirus behandelt, der mit der C-Fragment-Tetanustoxin-cDNA und der CD40-Antisense-cDNA versehen ist;
6. mit einem Retrovirus behandelt, der mit der C-Fragment-Tetanustoxin-cDNA, der CD40-Antisense-cDNA und der CTLA4Ig-cDNA versehen ist.

Die Messungen wurden sieben Tage nach Beginn der Behandlungen durchgeführt. Der T-Zell-Proliferation-Assay wurde mit dem EZ4U-Kit (BIOMEDICA, Wien, Österreich) durchgeführt.

Reaktion der T-Zellen in relativen Einheiten:

zu 1.:	0
zu 2.:	0
zu 3.:	+++
zu 4.	+
zu 5.:	++
zu 6.:	+

Diskussion

Der Versuch zeigt, daß die Gesamtheit der T-Zell-vermittelten Immunreaktionen gegen in diesem Falle Tetanustoxin vermindert werden kann, wenn die Monozyten nicht nur spezifisch antigene Determinaten des Tetanustoxins präsentieren, sondern zusätzlich die Bindung von B7- und/oder CD40-Molekülen an die entsprechenden Liganden verhindert wird. Hier sind sowohl Th1 als auch Th2 T-Zell-Aktivierungen vermindert worden. Die Blockade von B7 ist dabei effizienter als die von CD40.

Ergebnisse an Tieren, *in vivo*

Der Versuchsansatz enthält Tests, mit Monozyten und T-Lymphozyten. Die Monozyten wurden

1. nicht genetisch verändert;
2. mit einem Retrovirus behandelt, der keine therapeutischen Gene enthält;
3. mit einem Retrovirus behandelt, der mit der OvalbuminIi-cDNA versehen ist;
4. mit einem Retrovirus behandelt, der mit der OvalbuminIi-cDNA und der CTLA4Ig-cDNA versehen ist;
5. mit einem Retrovirus behandelt, der mit der OvalbuminIi-cDNA und der CD40-Antisense-cDNA versehen ist;
6. mit einem Retrovirus behandelt, der mit der OvalbuminIi-cDNA, der CD40-Antisense-cDNA und der CTLA4Ig-cDNA versehen ist.

OvalbuminII bedeutet, daß das Ovalbumin mit einer Signalsequenz für das MHC II-Kompartiment versehen wurde, um seine Fragmente mit größerer Effizienz an MHC II präsentieren zu lassen.

Antikörperspiegel der gegen Ovalbumin geimpften Mäuse in relativen Einheiten:

Zeit in Wochen	0	1	4	8
zu 1.:	+++++	+++++	+++++	++++
zu 2.:	+++++	+++++	+++++	++++
zu 3.	+++++	+++++	++++++	++++++
zu 4.:	+++++	+++++	+++	++
zu 5.:	+++++	+++++	++++	+++
zu 6.:	+++++	+++++	+++	++

Diskussion

Der Versuch zeigt, dass die humorale Immunantwort gegen in diesem Falle Ovalbumin vermindert werden kann, wenn die Monozyten nicht nur spezifisch antigene Determinanten des Ovalbumins präsentieren, sondern zusätzlich die Bindung von B7- und/oder CD40-Molekülen an die entsprechenden Liganden verhindert wird. Wir haben hier vor allem Th2 T-Zell-Aktivierungen beobachtet. Die Blockade von B7 ist dabei effizienter als die von CD40. Es hat sich auch gezeigt, dass die Verwendung der Signalsequenz der Invarianten Kette gut geeignet ist, um den gewünschten Effekt zu erhalten. In den beiden gezeigten Beispielen wurde das System an Menschen- und Mäuseblut getestet. Es zeigte sich, dass sowohl in vitro, als auch in vivo eine Unterdrückung spezifischer Immunantworten möglich ist.

Neben der erfindungsgemäß beschriebenen Transduktion von Antigen-präsentierenden Zellen sind dem Fachmann auch andere Möglichkeiten zur Transduktion, wie die Verwendung anderer Viren oder der nicht-virale Gentransfer an sich bekannt.

Literatur

Daikh D., Wofsy D. and Imboden J. (1997) The CD28-B7 costimulatory pathway and its role in autoimmune disease. *J Leukoc Biol* **62**, 165-62.

Greenfield E., Nguyen K. and Kuchroo V. (1998) CD28/B7 costimulation: a review. *Crit Rev Immunol* **18**, 389-418

Janeway J.C.A. and Travers P. (1997) Immunobiology - The immune system in health and disease. Current Biology Ltd./Garland Publishing Inc., London, San Francisco and New York

Johnson-Leger C., Christensen J. and Klaus G. (1998) CD28 co-stimulation stabilizes the expression of the CD40 ligand on T cells. *Int Immunol* **10**, 1083-91

McAdam A., Schweitzer A. and Sharpe A. (1998) The role of B7 costimulation in activation and differentiation of CD4+ and CD8+ T cells. *Immunol Rev* **165**, 231-47

Steinman L. (1994) Autoimmunerkrankungen. Spektrum der Wissenschaften (Spezial: Das Immunsystem) 64-73.

Vyth-Dreese F., DelleMijn T., Majoer D. and de Jong D. (1995) Localization in situ of the co-stimulatory molecules B7.1, B7.2, DC40 and their ligands in normal human lymphoid tissue. *Eur J Immunol* **25**, 3023-9

Linsley Peter S; Ledbetter Jeffrey A; Damle Nitin K; Brady William
(Publication date: 1993-01-07) CTL4A RECEPTOR, FUSION PROTEINS CONTAINING IT AND USES THEREOF. Patent Number: WO9300431

Bertran J. Miller, J., Yang, Y., et al., . (1996) *Recombinant adeno-associated virus-mediated high-efficiency, transient expression of the murine cationic amino acid transporter (ecotropic retroviral receptor) permits stable*

transduction of human HeLa cells by ecotropic retroviral vectors. J-Virol. **70**, 6759-66.

Boshart M., Weber F., Jahn G., Dorsch-Hasler K., Fleckenstein B. and Schaffner W. (1985) A very strong enhancer is located upstream of an immediate early gene of human cytomegalovirus. *Cell* **41**, 521-30.

Danos O.a.M. R.C. (1988) *Safe and efficient generation of recombinant retroviruses with amphotropic and ecotropic host ranges. Genetics* **85**, 6460-6464.

Fields B.N. (1996) *Fields Virology*. Lippincot-Raven, Philadelphia

Fred M. Ausubel R.B. Robert E. Kingston, David D. Moore, J.G. Seidman, John A. Smith, Kevin Struhl (1999) *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons, New York

Hildinger M., Schilz A., Eckert H.G., Bohn W., Fehse B., Zander A., Osertag W. and Baum C. (1999) Bicistronic retroviral vectors for combining myeloprotection with cell-surface marking. *Gene Ther* **6**, 1222-30.

Hunt N. Laker, C., Stocking, C., et al. (1987) *Retroviral vectors for gene transfer into and gene expression in hematopoietic cells*. In *Advanced Research Workshop "Molecular and Cellular Aspects of Erythropoiesis"*, (Rich I.N., eds) Berlin: Springer-Verlag, pp. 103-121.

John E. Coligan A.M.K. David H. Margulies, Ethan M. Shevach, Warren Strober (1999) *Current Protocols in Immunology*. John Wiley & Sons, New York

Juan S. Bonifacino M.D. Jennifer Lippincott-Schwartz, Joe B. Harford, and Kenneth M. Yamada (1999) *Current Protocols in Cell Biology*. John Wiley & Sons, New York

Nelson J.A., Reynolds-Kohler C. and Smith B.A. (1987) Negative and positive regulation by a short segment in the 5'-flanking region of the human cytomegalovirus major immediate-early gene. *Mol Cell Biol* **7**, 4125-9.

Porter C.D. Collins, M., Tailor, C., et al. (1996) *Comparison of efficiency of infection of human gene therapy target cells via four different retroviral receptors.* *Hum Gene Ther* **7**(), 913-9.

Patentansprüche

1. Antigen präsentierende Zelle, die überwiegend vorher bestimmte Antigene präsentiert (monoantigene antigen-präsentierende Zelle) dadurch gekennzeichnet, dass die monoantigene antigen-präsentierende Zelle teilungsfähig ist und eine der Funktionen co-stimulatorischer Rezeptoren der Zelle, wie ein B7- und/oder CD40-Rezeptor supprimiert ist.
2. Monoantigene antigen-präsentierende Zelle nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die monoantigene antigen-präsentierende Zelle ein Monozyt, eine dendritische Zelle und/oder ein Makrophage ist.
3. Monoantigene antigen-präsentierende Zelle nach Anspruch 1 und/oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass durch Transformation einer antigen-präsentierenden Zelle mit nukleinsäurehaltigem Material eine erhöhte Expression eines Antigens erfolgt und die antigen-präsentierende Zelle im wesentlichen nur eine Sorte eines Antigens präsentiert.
4. Monoantigene antigen-präsentierende Zelle nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass die monoantigene antigen-präsentierende Zelle eine erhöhte Anzahl von Homing-Rezeptoren, wie CD44, aufweist.
5. Monoantigene antigen-präsentierende Zelle nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass eine Transformation eine Suppression von Funktionen der B7-, CD40-Rezeptoren und/oder eine Erhöhung der Anzahl von Homing-Rezeptoren bewirkt.
6. Monoantigene antigen-präsentierende Zelle nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 5 enthaltend Antisense-Nukleinsäuren zur Verhinderung der B7- und/oder CD40-Rezeptor Expression.

7. Monoantigene antigen-präsentierende Zelle nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 5 enthaltend Nukleinsäuren, die eine Unterdrückung der Expression der B7- und/oder CD40-Rezeptoren durch Co-Suppression bewirken.
8. Monoantigene antigen-präsentierende Zelle nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 7 enthaltend Nukleinsäuren, die eine Expression von mit B7- und/oder CD40-Rezeptoren affinen Strukturen aufweisenden Proteinen oder Peptiden bewirken.
9. Monoantigene antigen-präsentierende Zelle nach Anspruch 8, wobei die Proteine, die affine Strukturen zu B7-Rezeptoren aufweisen CTLA4, CD28, Antikörper, F(ab)₂, scFv und/oder F_{ab}-Fragmente sind.
10. Monoantigene antigen-präsentierende Zelle nach Anspruch 8 und/oder 9, wobei die Nukleinsäuren für eine Signalsequenz kodieren oder die Expressionsprodukte eine Signalsequenz besitzen, die den Verbleib der Expressionsprodukte im endoplasmatischen Retikulum, dem Golgi-Apparat, dem Trans-Golgi-Netzwerk oder intrazellulären Vesikeln bewirkt.
11. Monoantigene antigen-präsentierende Zelle nach mindestens einem der Ansprüche 3 bis 10, dadurch gekennzeichnet, dass die monoantigene antigen-präsentierende Zelle zur Expression von Antigenen mit Nukleinsäuren transformiert ist, die den Transport der exprimierten Antigene in MHC II-Kompartimente der Zellen ermöglicht.
12. Monoantigene antigen-präsentierende Zelle nach mindestens einem der Ansprüche 3 bis 11, dadurch gekennzeichnet, dass die Nukleinsäuren DNA, RNA, Oligonukleotide, Polynukleotide, Ribozyme, Peptidnukleinsäuren (PNA) sind.

13. Monoantigene antigen-präsentierende Zelle nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, dass die DNA Regulationselemente wie Enhancer, Promotoren, polyA-kodierende 3'-Enden zur Transkription der DNA in RNA enthält, die RNA Regulationselemente zur Translation der RNA in Protein enthält.
14. Verfahren zur Herstellung der monoantigenen antigen-präsentierenden Zelle nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 13 durch ex vivo oder in vivo Verfahren.
15. Verfahren nach Anspruch 14, wobei eine antigen-präsentierende Zelle ex vivo oder in vivo durch Behandlung mit Viren, viralen Vektoren, bakteriellen Vektoren, Plasmiden, die durch viralen Gentransfer, Elektroporationstechniken, Iontophorese, ballistischen Methoden und/oder anderen Techniken zur Einschleusung von Molekülen in eine monoantigene antigen-präsentierende Zelle transformiert wird.
16. Verfahren nach Anspruch 14 und/oder 15, wobei eine antigen-präsentierende Zelle oder eine monoantigene antigen-präsentierende Zelle durch Behandlung mit Viren, viralen Vektoren, bakteriellen Vektoren, Plasmiden die durch viralen Gentransfer, Elektroporationstechniken, Iontophorese, ballistischen Methoden und/oder anderen Techniken zur Einschleusung von Molekülen in eine Zelle mit supprimierter Funktion co-stimulatorischer Rezeptoren transformiert, die Expression co-stimulatorischer Rezeptoren durch Verhinderung deren Expression oder die co-stimulatorischen Rezeptoren durch Reaktion mit affinen Strukturen an einer Stimulation von T-Zellen, die an die monoantigene antigen-präsentierende Zelle gebunden sind, verhindert wird.
17. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 14 bis 16, wobei Moleküle wie Antikörper, Proteine, Peptide, Peptidomimetica, CTLA4, CD28, CD40L und/oder Bestandteile und/oder Kombinationen dieser Moleküle,

die z.B. B7-1, B7-2, CD40 binden, welche eine in Gegenwart einer Antigenpräsentation stattfindende Co-Stimulation der T-Zelle behindert, mit der monoantigenen antigen-präsentierenden Zelle oder der antigen-präsentierenden Zelle in Kontakt gebracht werden.

18. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 14 bis 17, wobei die Moleküle gemäß Anspruch 17 durch Vehikel, wie Liposomen, Hydrogele, Zyklodextrine, biologisch abbaubare Nanokapseln, bio-adhäsive Mikrokugeln und/oder durch Elektroporationstechniken, Iontophorese, ballistische Methoden und/oder andere Techniken zur Einschleusung von Molekülen in die monoantigene antigen-präsentierende Zelle oder die antigen-präsentierende Zelle transferiert werden.
19. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 14 bis 18, wobei Nukleinsäuren durch Viren, virale Vektoren, bakterielle Vektoren, Plasmide die durch viralen Gentransfer, Elektroporationstechniken, Iontophorese, ballistische Methoden und/oder andere Techniken zur Einschleusung von Molekülen in die antigen-präsentierende Zelle oder die antigen-präsentierende Zelle transferiert werden.
20. Arzneimittel enthaltend mindestens eine monoantigene antigen-präsentierende Zelle nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 13.
21. Arzneimittel nach Anspruch 20, wobei mindestens eine monoantigene antigen-präsentierende Zelle als Infusionslösung zur intravenösen oder intraperitonealen Applikation formuliert ist.
22. Verwendung mindestens einer monoantigenen antigen-präsentierenden Zelle nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 13 zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung von ungewollten Immunreaktionen, wie Autoimmunerkrankungen und Allergien oder gewollt hervorgerufenen Immunreaktionen, wie bei Immunisierungen.

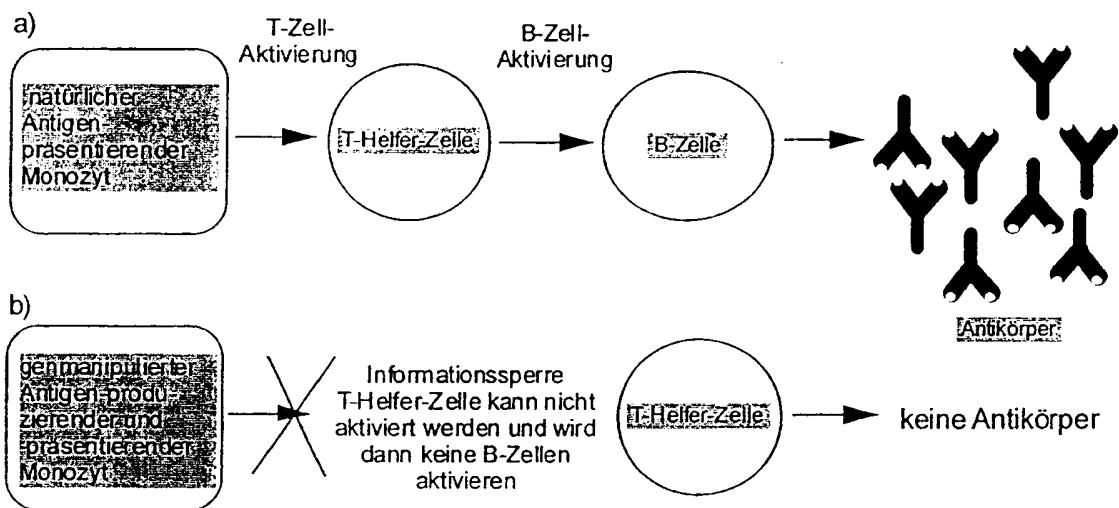
23. Verwendung mindestens einer monoantigenen antigen-präsentierenden Zelle nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 13 zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung von Immunreaktionen gegen allogene und/oder xenogene Gewebsmerkmale.

24. Verwendung nach Anspruch 22, wobei die zu behandelnden Immunreaktionen in Verbindung mit Antigenen oder deren Gensequenzen und/oder Teilen davon stehen ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus

- Enzymen, deren Gensequenzen und/oder Teilsequenzen, insbesondere Glutamic acid decarboxylase (GAD), Rezeptor-Typ Protein Tyrosin Phosphatase IA-2Beta, H^+K^+ ATPase, U1RNP, Transglutaminase, Argininosuccinatelyase (ASL), Tyrosinase-related protein-2, Thyroid Peroxidase, Faktor VIII, Faktor IX;
- Rezeptoren, deren Gensequenzen und/oder Teilsequenzen, insbesondere Acetylcholinrezeptor vom Nicotintyp, Myasthenia gravis, β 1-adrenerger Rezeptor, α 1-adrenerger-Rezeptor, Angiotensin-2-AT1-Rezeptor, Glutamat-Rezeptor, Thyrotropin-stimulierendes Hormon (TSH)-Rezeptor, LFA-1, HLA-B27, Epididymal Protein DE, Zona Pellucida (ZP)-3 Glycoprotein, Zona Pellucida (ZP)-4 Glycoprotein, Follicle-Stimulating Hormone (FSH) Rezeptor, Sperm Immunogen SP-10 oder Sperm Protein SP-10;
- Hormone oder Botenstoffe, deren Gensequenzen und/oder Teilsequenzen, insbesondere Insulin, Thyroglobulin, Follicle-Stimulating Hormone (FSH), Prostaglandin F2 alpha, Gonadotropin-Releasing Hormone (GnRH), Oestradiol-17beta, Oestrogen, Luteinizing Hormon (LH) Rezeptor, Inhibin, Testosteron, Androgen, Chorionic Gonadotrophin (CG), Interleukine, Interferone, Cytokine, Chemokine, Bone Morphogenetic Factors, β -Interferon, Estradiol;

- Strukturproteine, deren Gensequenzen und/oder Teilsequenzen, insbesondere Myelin Basic Protein (MBP), Proteolipid protein (PLP), Myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG), α -Fodrin, Nicht-erythroides α -Spectrin, Beta-Amyloid Precursor Protein (beta-APP), Typ 2 Kollagen, Sperm Plasma Membran Protein PH-20;
- Antigene, deren Gensequenzen und/oder Teilsequenzen, insbesondere CENP- A Autoantigen, Beta2GP-I, ribosomales P Protein, Ro/SSA, La/SSB, Sm/RNP, Sm, Scl-70, Jo-1, BCOADC-E2, Albumin, Glucagon, Inselzellantigene, Retinal S Ag;
- Allergene, die eine IgE-Antwort auslösen, deren Gensequenzen und/oder Teilsequenzen, insbesondere Der f 1, Der f 2, Der f 3, Der p 1, Der p 2, Der p 3, Der p 4, Der p 5, Der p 8, Eur m 1, Lep d 2, Fel d 1, Can f 1, Can f 2, Mus m 1, Rat n 1, Bla g 1, Bla g 2, Bla g 4, Bla g 5, Per a 1, Bienengift Phospholipase A₂ (PLA₂), Group V major allergen Phl p 5b von Timothy Grass Pollen, Hom s 1.

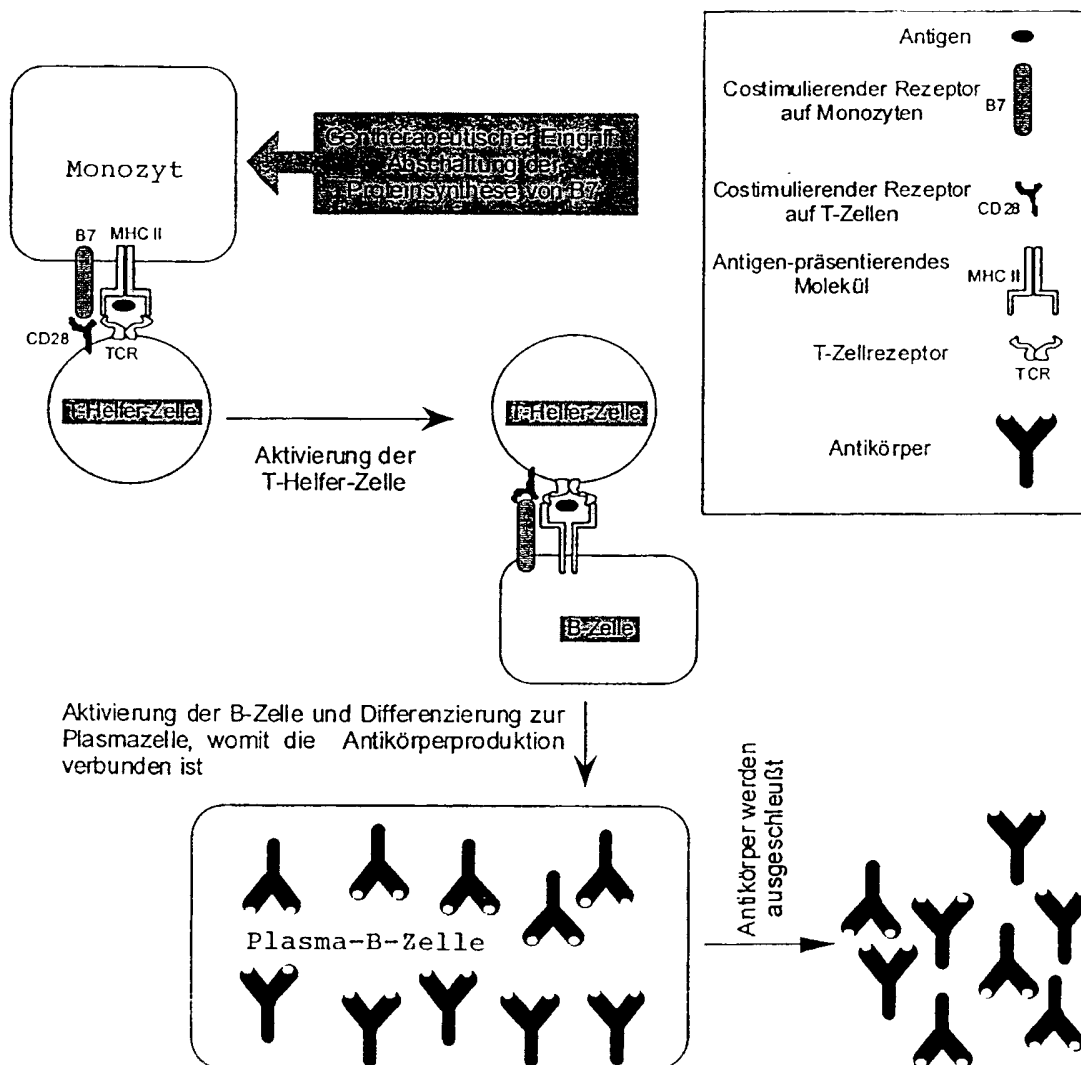
25. Verwendung nach Anspruch 23, wobei die zu behandelnden Immunreaktionen in Verbindung mit allologenen und/oder xenologen Gewebsmerkmalen, deren Gensequenzen und/oder Teilsequenzen, insbesondere MHC I, MHC II, Rhesus Faktor steht.

Figur 1: Funktion der Genmanipulation auf zellulärer Ebene

a) normaler Mechanismus der T-Helfer-Zell-Aktivierung über Monozyten

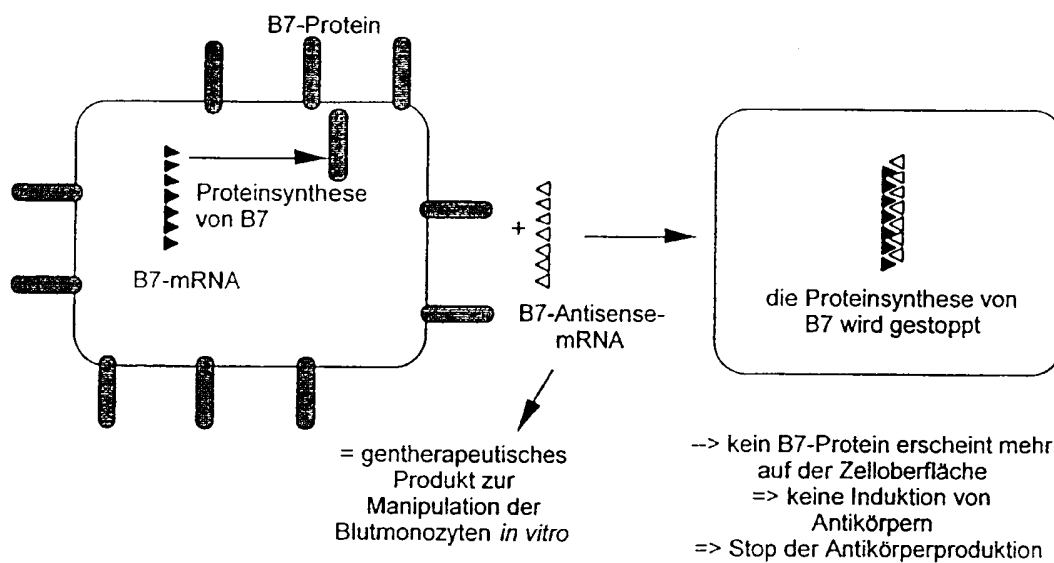
b) Mechanismus der Monozyten nach Genmanipulation. Ausbleiben der T-Helfer-Zell-Aktivierung nach Genmanipulation der Monozyten.

Figur 2: "Normale" Immunreaktion zur Antikörperbildung, Antigen-präsentierende Monozyten als Induktoren der Antikörperproduktion.



- 3/6 -

Figur 3: Funktion der Genmanipulation auf molekularer Ebene: der Co-stimulierende Rezeptor B7 wird inaktiviert



Figur 4(I): Funktion der Genmanipulation auf molekularer Ebene: das Auto-antigen wird von den B7-inhibierten antigenpräsentierenden Zellen synthetisiert

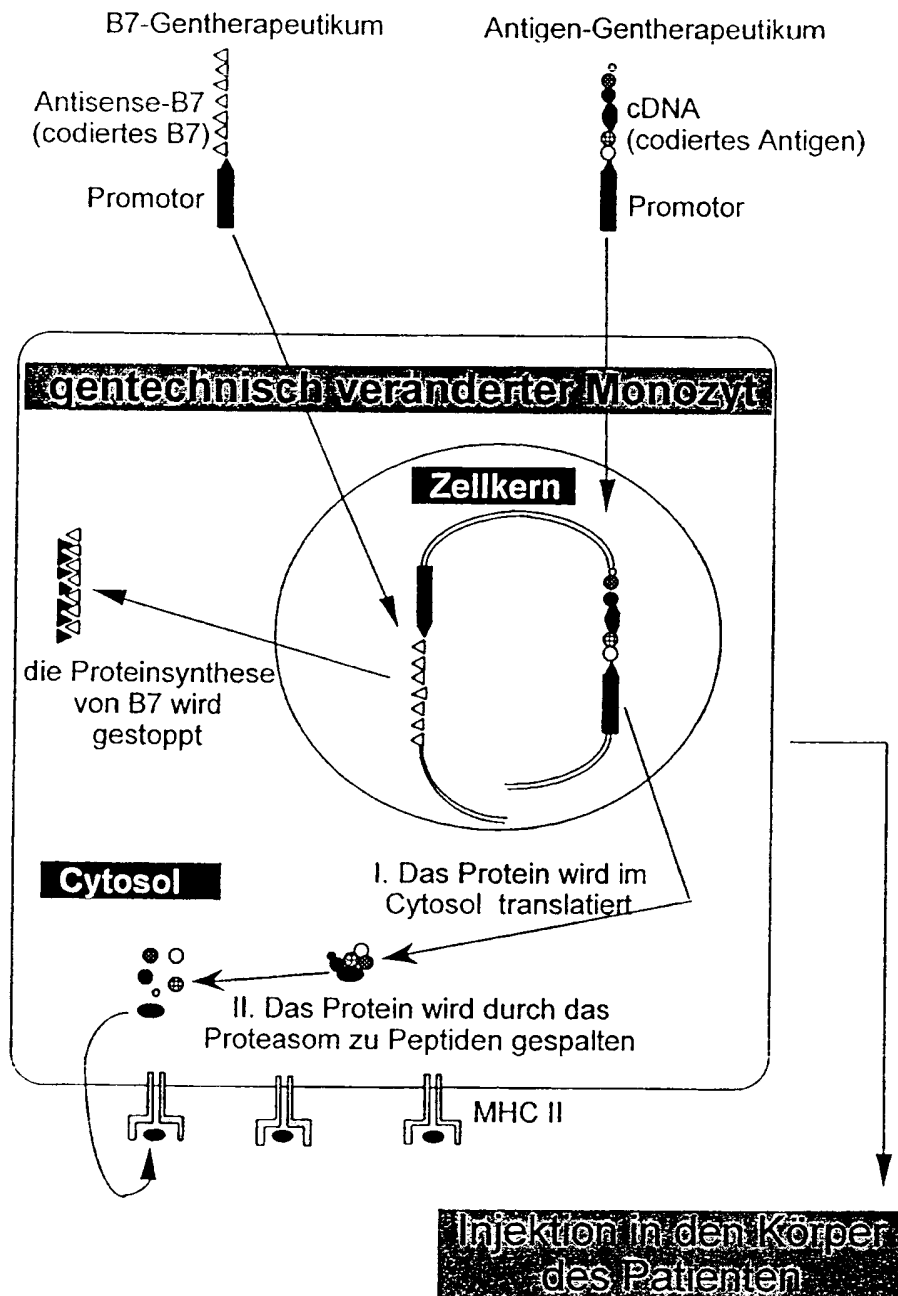
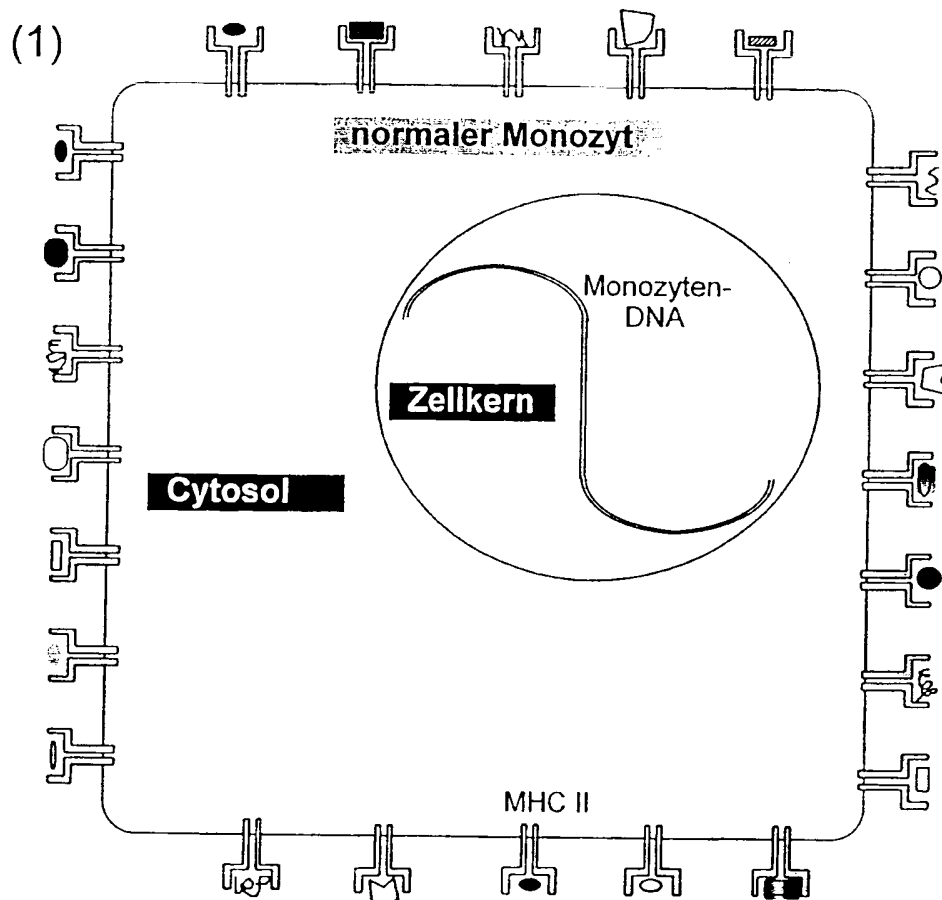


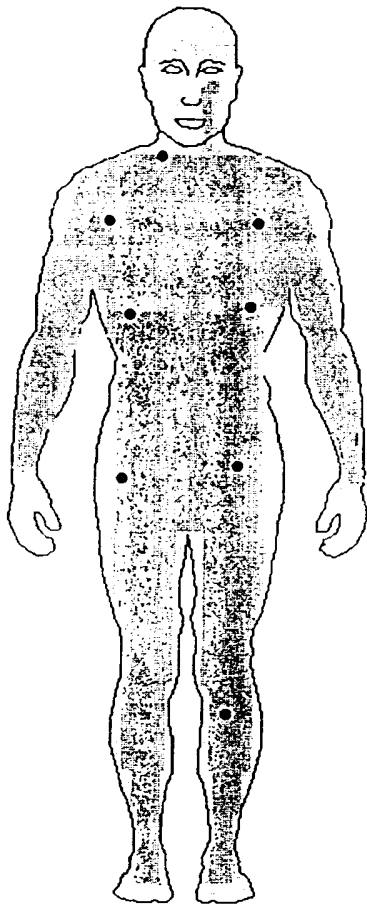
Abb. 4(II): Vergleich der Antigenpräsentation von "normalen" (1) und gentechnisch veränderten (2) Monozyten. Siehe auch Abb. 4(I).

Autoantigenmengen, die an den MHC II präsentiert werden

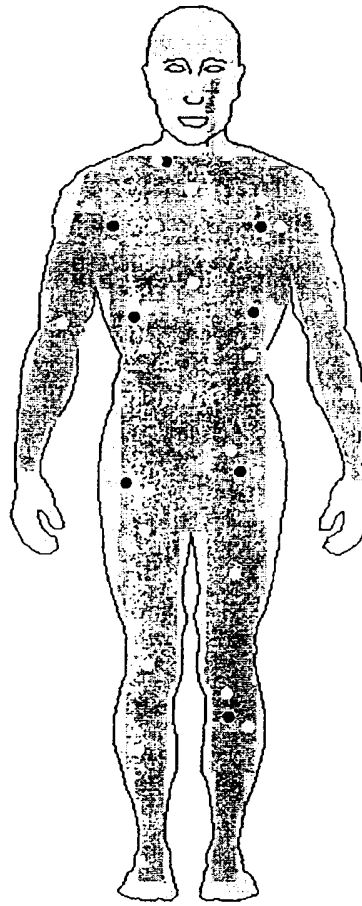


Normale Monozyten präsentieren selten das Autoantigen und wenn, dann es nur von wenigen MHC II präsentiert.

Fig. 5: Funktion der genmanipulierten Monozyten im Körper
5.



- natürliche Autoantigen-präsentierende Monozyten induzieren die Produktion von (pathologischen) Autoantikörpern, wenn sie B7-positiv sind



- genmanipulierte Monozyten konkurrieren mit den natürlichen Autoantigen-präsentierenden Monozyten und drosseln die Autoantikörperproduktion

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 00/03984

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12N5/10 A61K35/14 A61K48/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12N A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

WPI Data, EPO-Internal, PAJ, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	WO 99 25812 A (HEMOSOL, INC.) 27 May 1999 (1999-05-27)	1-3, 5, 7, 10-15, 18-25
Y	page 3, line 31 - page 4, line 26; claims 46-49, 52 page 7, line 24 - page 8, line 10 page 21, line 6 - line 19 page 21, line 29 - page 22, line 20 ----- -/-	4, 6, 8, 9, 16, 17

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

17 July 2000

Date of mailing of the international search report

28/07/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040. Tx. 31 651 epo nl.
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Ryckebosch, A

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 00/03984

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>DATABASE BIOSIS 'Online! BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE, PHILADELPHIA, PA, US; 1992 SHIOTA Y ET AL: "INDUCTION OF UP-MODULATION OF HOMING RECEPTORS IN CLONED HEMOPOIETIC PROGENITORS BY GROWTH FACTORS" Database accession no. PREV199293119387 XP002142748 abstract & BONE MARROW TRANSPLANTATION, vol. 9, no. 2, 1992, pages 123-127, ISSN: 0268-3369</p> <p>---</p>	4
Y	<p>WO 98 29124 A (ISIS PHARMACEUTICALS, INC.) 9 July 1998 (1998-07-09) cited in the application page 4, line 4 -page 9, line 4; claims 1,22</p> <p>---</p>	6
Y	<p>L. LU ET AL.: "TRANSDUCTION OF DENDRITIC CELLS WITH ADENOVIRAL VECTORS ENCODING CTLA4-Ig MARKEDLY REDUCES THEIR ALLOSTIMULATORY ACTIVITY." TRANSPLANTATION PROCEEDINGS, vol. 31, no. 1/2, March 1999 (1999-03), page 797 XP000915484 NEW YORK, N.Y., US the whole document</p> <p>---</p>	8,9,16, 17
P,Y	<p>R.W. O'ROURKE ET AL.: "A DENDRITIC CELL LINE GENETICALLY MODIFIED TO EXPRESS CTLA4-Ig AS A MEANS TO PROLONG ISLET ALLOGRAFT SURVIVAL." TRANSPLANTATION, vol. 69, no. 7, 15 April 2000 (2000-04-15), pages 1440-1446, XP000915486 BALTIMORE, US page 1444, right-hand column, paragraph 2 -page 1446, left-hand column, paragraph 1</p> <p>---</p>	8,9,16, 17
A	<p>F. FU ET AL.: "COSTIMULATORY MOLECULE-DEFICIENT DENDRITIC CELL PROGENITORS (MHC CLASS II+, CD80dim, CD86-) PROLONG CARDIAC ALLOGRAFT SURVIVAL IN NONIMMUNOSUPPRESSED RECIPIENTS." TRANSPLANTATION, vol. 62, no. 5, 15 September 1996 (1996-09-15), pages 659-665, XP000929113 BALTIMORE, US page 662, right-hand column, line 4 -page 664, right-hand column, paragraph 1</p> <p>---</p> <p style="text-align: center;">-/--</p>	1-25

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 00/03984

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, A	<p>WO 99 50394 A (I.D.M. IMMUNO-DESIGNED MOLECULES) 7 October 1999 (1999-10-07) cited in the application claims 1,7,22-24</p> <p>-----</p>	1-25

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 00/03984

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9925812 A	27-05-1999	AU 1220599 A	07-06-1999
WO 9829124 A	09-07-1998	US 6077833 A	20-06-2000
		AU 5705198 A	31-07-1998
		EP 0957926 A	24-11-1999
WO 9950394 A	07-10-1999	AU 3601499 A	18-10-1999

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 00/03984

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 7 C12N5/10 A61K35/14 A61K48/00

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 7 C12N A61K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

WPI Data, EPO-Internal, PAJ, BIOSIS

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
P, X	WO 99 25812 A (HEMOSOL, INC.) 27. Mai 1999 (1999-05-27)	1-3,5,7, 10-15, 18-25
Y	Seite 3, Zeile 31 -Seite 4, Zeile 26; Ansprüche 46-49,52 Seite 7, Zeile 24 -Seite 8, Zeile 10 Seite 21, Zeile 6 - Zeile 19 Seite 21, Zeile 29 -Seite 22, Zeile 20 --- -/--	4,6,8,9, 16,17

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfindenscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfindenscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

17. Juli 2000

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

28/07/2000

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Ryckebosch, A

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	<p>DATABASE BIOSIS 'Online! BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE, PHILADELPHIA, PA, US; 1992 SHIOTA Y ET AL: "INDUCTION OF UP-MODULATION OF HOMING RECEPTORS IN CLONED HEMOPOIETIC PROGENITORS BY GROWTH FACTORS" Database accession no. PREV199293119387 XP002142748 Zusammenfassung & BONE MARROW TRANSPLANTATION, Bd. 9, Nr. 2, 1992, Seiten 123-127, ISSN: 0268-3369</p> <p>---</p>	4
Y	<p>WO 98 29124 A (ISIS PHARMACEUTICALS, INC.) 9. Juli 1998 (1998-07-09) in der Anmeldung erwähnt Seite 4, Zeile 4 -Seite 9, Zeile 4; Ansprüche 1,22</p> <p>---</p>	6
Y	<p>L. LU ET AL.: "TRANSDUCTION OF DENDRITIC CELLS WITH ADENOVIRAL VECTORS ENCODING CTLA4-Ig MARKEDLY REDUCES THEIR ALLOSTIMULATORY ACTIVITY." TRANSPLANTATION PROCEEDINGS, Bd. 31, Nr. 1/2, März 1999 (1999-03), Seite 797 XP000915484 NEW YORK, N.Y., US das ganze Dokument</p> <p>---</p>	8,9,16, 17
P,Y	<p>R.W. O'ROURKE ET AL.: "A DENDRITIC CELL LINE GENETICALLY MODIFIED TO EXPRESS CTLA4-Ig AS A MEANS TO PROLONG ISLET ALLOGRAFT SURVIVAL." TRANSPLANTATION, Bd. 69, Nr. 7, 15. April 2000 (2000-04-15), Seiten 1440-1446, XP000915486 BALTIMORE, US Seite 1444, rechte Spalte, Absatz 2 -Seite 1446, linke Spalte, Absatz 1</p> <p>---</p>	8,9,16, 17
A	<p>F. FU ET AL.: "COSTIMULATORY MOLECULE-DEFICIENT DENDRITIC CELL PROGENITORS (MHC CLASS II+, CD80dim, CD86-) PROLONG CARDIAC ALLOGRAFT SURVIVAL IN NONIMMUNOSUPPRESSED RECIPIENTS." TRANSPLANTATION, Bd. 62, Nr. 5, 15. September 1996 (1996-09-15), Seiten 659-665, XP000929113 BALTIMORE, US Seite 662, rechte Spalte, Zeile 4 -Seite 664, rechte Spalte, Absatz 1</p> <p>---</p>	1-25
	-/--	

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 00/03984

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
P,A	WO 99 50394 A (I.D.M. IMMUNO-DESIGNED MOLECULES) 7. Oktober 1999 (1999-10-07) in der Anmeldung erwähnt Ansprüche 1,7,22-24 -----	1-25

INTERNATIONALER RESEARCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 00/03984

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9925812 A	27-05-1999	AU 1220599 A	07-06-1999
WO 9829124 A	09-07-1998	US 6077833 A	20-06-2000
		AU 5705198 A	31-07-1998
		EP 0957926 A	24-11-1999
WO 9950394 A	07-10-1999	AU 3601499 A	18-10-1999